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

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE AMOXICILINA/CLAVULANICO
Y CIPROFLOXACINO *IN VITRO* Y EN UN MODELO
EXPERIMENTAL DE NEUMONIA POR CEPAS DE
STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE DE DIFERENTE SEROTIPO Y
SENSIBILIDAD A PENICILINA**



TESIS DOCTORAL

Yolanda García García

Madrid, Abril 1997



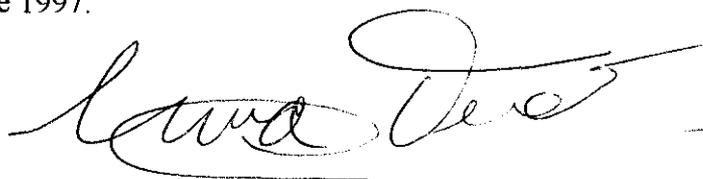
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
28040 MADRID

D. JOSE PRIETO PRIETO, Catedrático del Departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y D^a. MARIA LUISA GOMEZ-LUS CENTELLES, Profesora Titular del Departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

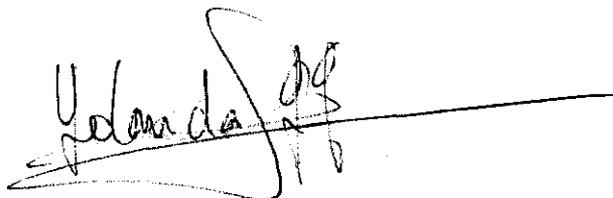
CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación, titulado: ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE AMOXICILINA/CLAVULANICO Y CIPROFLOXACINO *IN VITRO* Y EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE NEUMONIA POR CEPAS DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* DE DIFERENTE SEROTIPO Y SENSIBILIDAD A PENICILINA, constituye la Memoria presentada por Yolanda García García para aspirar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas, y ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste, expedimos y firmamos el presente certificado en Madrid, Abril de 1997.



Fdo. Profa. Dra. M^a. Luisa Gómez-Lus Centelles Fdo. Prof. Dr. José Prieto Prieto



Quiero expresar mi agradecimiento:

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

A la Profa. Dra. M^a Luisa Gómez-Lus Centelles, por su continuo estímulo y ayuda, por su dedicación en la preparación y revisión de este trabajo, y por sus siempre optimistas consejos.

A la Dra. M^a José Alonso Martín, por su ayuda en la realización e interpretación de los estudios de anatomía patológica.

A la Dra. M^a del Carmen Ramos Tejera, sin cuya ayuda este trabajo nunca hubiera podido realizarse, por su constante apoyo y amistad.

A Guadalupe, Lidia y M^a José, compañeras de equipo, por todo el trabajo realizado.

A todos los compañeros/as del Departamento que han colaborado, con su apoyo y comprensión, en la realización de este trabajo; por los buenos ratos pasados.

A Jose.

A mi familia.

A mis padres.

INDICE

INDICE

ABREVIATURAS

LINTRODUCCION	1
1. NEUMONIA	2
2. MODELOS EXPERIMENTALES DE NEUMONIA	4
2.1. PERSPECTIVA HISTORICA	4
2.2. TIPOS DE MODELO	5
2.2.1. Según vía de inoculación	6
2.2.2.1. Inoculación intratraqueal	6
2.2.1.2. Inoculación por inhalación con aerosoles.....	6
2.2.1.3. Inoculación por vía orofaríngea	7
2.2.2. Según la especie de animal de experimentación	7
2.3. PARAMETROS DE ESTUDIO.....	7
3. <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	8
3.1. INTRODUCCION HISTORICA	8
3.2. MICROBIOLOGIA DEL NEUMOCOCO	9
3.2.1. Morfología	9
3.2.2. Condiciones de crecimiento	10
3.2.3. Pruebas bioquímicas y de identificación	11
3.3. ANALISIS ESTRUCTURAL	12
3.3.1. Cápsula	12
3.3.2. Pared celular	14
3.3.3. Membrana citoplasmática	14
3.4. ANALISIS ANTIGENICO	14
3.4.1. Antígenos capsulares	14
3.4.2. Antígenos no capsulares	15
3.5. VIRULENCIA Y DEFENSAS DEL HUESPED	16
3.6. CLASIFICACION SEROLOGICA	18
3.7. INFECCION NEUMOCOCICA	18
3.7.1. Neumonía	19
3.8. SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS	19
3.9. INMUNIDAD. VACUNAS	20
4. ANTIMICROBIANOS	21

4.3.2. Actividad antibacteriana	39
4.3.3. Farmacocinética	39
II. OBJETIVOS	40
III. MATERIAL Y METODOS	42
1. MATERIAL	43
1.1. MICROORGANISMOS	43
1.2. ANTIMICROBIANOS	43
1.3. ANIMALES	44
2. METODO	44
2.1. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>	44
2.1.1. Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias y Bactericidas (CMIs y CMBs).....	44
2.1.2. Curvas de letalidad	45
2.1.3. Efecto bactericida	45
2.1.4. Efecto postantibiótico (EPA)	46
2.2. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	47
2.2.1. Neutropenia	47
2.2.2. Modelo experimental de neumonía	47
2.2.2.1. Preparación del inóculo	47
2.2.2.2. Infección pulmonar	48
2.2.3. Determinación de la Mínima Dosis Letal (MDL) para cada cepa	48
2.2.4. Lesiones histopatológicas en pulmón	49
2.2.5. Tratamiento antimicrobiano	49
2.2.6. Curvas de supervivencia	50
2.2.7. Cálculo de las DE ₅₀ y DE ₉₀	51
2.2.8. Recuento del número de UFC en los pulmones. Curvas de letalidad <i>in vivo</i>	51
2.2.9. Presencia de microorganismos en sangre	53
2.2.10. Determinación de los niveles de antimicrobiano en suero y pulmón	53
2.3. ANALISIS ESTADISTICO	55

IV. RESULTADOS	56
1. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>	57
1.1. CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS Y BACTERICIDAS (CMI _s Y CMB _s)	57
1.2. CURVAS DE LETALIDAD	57
1.2.1. Curvas de letalidad de <i>S. pneumoniae</i> serotipo 3	57
1.2.2. Curvas de letalidad de <i>S. pneumoniae</i> serotipo 6	58
1.2.3. Curvas de letalidad de <i>S. pneumoniae</i> serotipo 9	59
1.3. EFECTO BACTERICIDA	60
1.4. EFECTO POSTANTIBIOTICO	60
2. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	61
2.1. DETERMINACION DE LA MDL PARA CADA CEPA	61
2.2. LESIONES HISTOPATOLOGICAS EN PULMON	61
2.2.1. Grupo control	62
2.2.2. Grupo 1: Ratones infectados por <i>S. pneumoniae</i> serotipo 3	62
2.2.3. Grupo 2: Ratones infectados por <i>S. pneumoniae</i> serotipo 6	62
2.2.4. Grupo 3: Ratones infectados por <i>S. pneumoniae</i> serotipo 9	63
2.3. CURVAS DE SUPERVIVENCIA	63
2.3.1. Curvas de supervivencia para <i>S. pneumoniae</i> serotipo 3	63
2.3.2. Curvas de supervivencia para <i>S. pneumoniae</i> serotipo 6	64
2.3.3. Curvas de supervivencia para <i>S. pneumoniae</i> serotipo 9	64
2.4. DE ₅₀ y DE ₉₀	67
2.5. CURVAS DE LETALIDAD <i>IN VIVO</i>	68
2.5.1. Curvas de letalidad <i>in vivo</i> de <i>S. pneumoniae</i> serotipo 3	68
2.5.2. Curvas de letalidad <i>in vivo</i> de <i>S. pneumoniae</i> serotipo 6	68
2.5.3. Curvas de letalidad <i>in vivo</i> de <i>S. pneumoniae</i> serotipo 9	69

2.6. PRESENCIA DE MICROORGANISMOS EN SANGRE	70
2.6.1. Presencia de <i>S. pneumoniae</i> serotipo 3 en sangre	70
2.6.2. Presencia de <i>S. pneumoniae</i> serotipo 6 en sangre	70
2.6.3. Presencia de <i>S. pneumoniae</i> serotipo 9 en sangre	71
2.7. NIVELES DE ANTIMICROBIANO EN SUERO	
Y PULMON	72
2.7.1. Rectas estándar	72
2.7.2. Curvas de concentración de antimicrobiano en suero y pulmón de ratón sin infectar e infectado	73
2.7.2.1. Amoxicilina	73
2.7.2.2. Ciprofloxacino	73
2.7.3. Parámetros farmacocinéticos	73
2.7.3.1. Amoxicilina	73
2.7.3.2. Ciprofloxacino	74
V. TABLAS Y FIGURAS	75
VI. DISCUSION	125
1. ELECCION DE LAS CEPAS BACTERIANAS Y ANTIMICROBIANOS	126
2. ANALISIS DEL METODO EXPERIMENTAL	128
2.1. ANALISIS DEL METODO EXPERIMENTAL <i>IN VITRO</i>	128
2.1.1. Curvas de letalidad	128
2.2.2. Efecto postantibiótico	128
2.2.2.1. Influencia del medio de cultivo	129
2.2.2.2. Influencia del pH del medio	129
2.2.2.3. Influencia de la agitación mecánica	130
2.2.2.4. Influencia de la concentración del inóculo inicial	130
2.2.2.5. Influencia de la fase de crecimiento de los microorganismos	131
2.2.2.6. Influencia de la concentración de antimicrobiano	132
2.2.2.7. Influencia del tiempo de exposición	

ABREVIATURAS

ABC	Area Bajo la Curva
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
C_{max}	Concentración máxima
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CMB	Concentración Mínima Bactericida
DE	Desviación Estándar
DE₅₀ y DE₉₀	Dosis Eficaz 50 y 90
DNA	Acido desoxirribonucleico
EPA	Efecto Postantibiótico
Homog. pulmón	Homogeneizado de pulmón
MDL	Mínima Dosis Letal
PBP_s	Proteínas fijadoras de penicilina
P.I.	Post-infección
RNA	Acido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
S.C.	Subcutánea
T>CMI	Tiempo en que los niveles de antimicrobiano están sobre la CMI
T_{max}	Tiempo al que se alcanza la C _{max}
T_{1/2}	Tiempo de vida media de un antimicrobiano
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UFC/r	UFC por ratón
V.O.	Vía oral

I. INTRODUCCION

1. NEUMONIA

La neumonía se define como un proceso inflamatorio del parénquima pulmonar, generalmente de origen infeccioso, y manifestada habitualmente, por la aparición de fiebre y de unos síntomas respiratorios variables, así como una expresión semiológica y radiológica características.

Las neumonías presentan una alta incidencia y una considerable mortalidad, en especial en personas de avanzada edad o con alguna enfermedad de base. En los países industrializados son la quinta causa de mortalidad y la primera entre las infecciones comunitarias (1).

Las neumonías se pueden clasificar siguiendo criterios etiológicos, clínicos, radiológicos, etc. Desde un punto de vista práctico, las neumonías se diferencian, en neumonías adquiridas en la comunidad o extrahospitalarias y en neumonías nosocomiales u hospitalarias. Las neumonías de la comunidad son las que ocurren en sujetos que viven en su domicilio y que no han estado ingresados en ningún hospital en los siete días previos, y también las que ocurren en pacientes ingresados que presentan una neumonía antes de las 24 a 48 horas del ingreso en el hospital. Las neumonías nosocomiales son las adquiridas en un hospital o en cualquier otra institución cerrada y que se presenta transcurridas al menos 48 horas del ingreso.

El agente etiológico implicado más frecuentemente en las neumonías comunitarias o extrahospitalarias es *Streptococcus pneumoniae* (40-80%) (2-5). En mucha menor proporción aparecen *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* y *Staphylococcus aureus*, considerados agentes de neumonías típicas o convencionales. Otros agentes implicados, considerados agentes de neumonías atípicas, son *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittacii*, *Coxiella burnetti*, *Legionella pneumophila* y virus respiratorios. La mayoría de las neumonías típicas extrahospitalarias se producen por la aspiración de microorganismos presentes habitualmente en la flora orofaríngea, o por la inhalación de microorganismos patógenos.

En el caso de las neumonías nosocomiales u hospitalarias, en pacientes previamente sanos con escasos días de ingreso es posible que la causa sea la misma que la de la neumonía comunitaria: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* o *Mycoplasma pneumoniae* entre otros. En pacientes con más días de hospitalización los microorganismos más frecuentemente implicados son los bacilos gramnegativos (60-70%) (6, 7), especialmente *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*. Entre los grampositivos, debe considerarse

Staphylococcus aureus (15%), el cual ha cobrado una mayor importancia en los últimos años por la aparición de brotes intrahospitalarios resistentes a meticilina y aminoglucósidos (MARSA) (7). La incidencia de *Legionella pneumophila* varía ampliamente como agente productor de neumonía nosocomial, mientras que las neumonías nosocomiales víricas son poco importantes, aunque se desconoce su verdadera incidencia. A pesar de los progresos realizados en la prevención y tratamiento de estas infecciones, las neumonías nosocomiales siguen siendo un importante problema entre los pacientes críticos, con unos índices de mortalidad elevados (8). Los mecanismos patogénicos de estas neumonías pueden ser distintos en cada caso, aunque la causa más frecuente son las microaspiraciones del contenido orofaríngeo, fenómeno favorecido por la introducción de microorganismos derivada de la manipulación instrumental de las vías aéreas del paciente (intubación, fibrobroncoscopia, ...). La existencia de una alteración o disminución en los sistemas de defensa mecánicos e inmunológicos, también contribuye a la proliferación local de las bacterias aspiradas desencadenando el proceso neumónico.

En el caso de los pacientes inmunodeprimidos, existe un riesgo elevado de infección que abarca un amplio abanico de posibilidades etiológicas. Los microorganismos más frecuentemente implicados son las bacterias tanto grampositivas como gramnegativas, seguidas por patógenos oportunistas como virus: Citomegalovirus y Herpes simplex, parásitos: *Pneumocystis carinii*, *Strongiloides stercoralis* y *Toxoplasma gondii* y hongos: *Aspergillus* spp., *Candida* spp., y *Cryptococcus* spp. Otros microorganismos que pueden verse implicados en estos procesos son *Legionella* spp., *Nocardia* spp., micobacterias y *Rhodococcus equi*. También se han podido aislar en casos de neumonías nosocomiales en pacientes inmunodeprimidos diferentes especies de bacterias corineformes, como *Corynebacterium jeikeium*, o *C. pseudodiphthericum*.

El diagnóstico etiológico preciso no se consigue, en la práctica, en muchas ocasiones. En todo caso, cuando se obtiene, se ha iniciado ya tratamiento antibiótico. Así pues, éste va a ser siempre empírico al inicio y su elección se basará necesariamente en la supuesta etiología y en la sensibilidad antibiótica de los patógenos involucrados. Dos hechos fundamentales condicionan esta elección: en primer lugar, la peculiar sensibilidad antibiótica de algunos de los principales patógenos involucrados en la infección respiratoria, a saber, pérdida progresiva de sensibilidad a penicilina G del neumococo, la frecuencia creciente de resistencia a los macrólidos, la persistencia de tasas altas de resistencia a otros antimicrobianos clásicos como cloranfenicol, tetraciclina y cotrimoxazol, la todavía poco conocida actividad de las nuevas quinolonas fluoradas frente a este patógeno junto a la resistencia a betalactámicos clásicos de *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*, debida principalmente a la producción de betalactamasas por parte de estos microorganismos.

Al buscar directrices que puedan orientar al clínico a la hora de elegir entre los diferentes antimicrobianos disponibles para esta indicación, nos encontramos con que los estudios *in vitro* no son suficientes, mientras que con los ensayos clínicos controlados no podemos obtener una respuesta objetiva debido a la falta de documentación etiológica y a la benignidad de algunos cuadros clínicos con una elevada tasa de curación espontánea. Necesitamos pues, estudios *in vivo* que sirvan de nexo de unión entre los estudios de sensibilidad *in vitro* y los ensayos clínicos.

2. MODELOS EXPERIMENTALES DE NEUMONIA

El uso de modelos animales de infección pulmonar para el estudio del tratamiento de la neumonía bacteriana es necesario aun cuando estos entrañan algunas dificultades. Es obvio que la infección en el tejido pulmonar tiene características peculiares y bien diferenciadas de las que tienen lugar en otros órganos o tejidos (9). Así, la patología y daños que se producen en el pulmón, la penetración y farmacocinética de los antimicrobianos en el pulmón, o el sistema inmune local del huésped, son específicos en el caso de la infección pulmonar. Por tanto, es imprescindible el uso de modelos experimentales de neumonía para la obtención de resultados extrapolables a la clínica humana.

Hay que tener en cuenta que en animales de laboratorio las infecciones en pulmón no son tan fáciles de producir como lo son en otros tejidos (piel, peritoneo, muslo,...). A pesar de ello, se han diseñado una amplia variedad de modelos animales de neumonía en los últimos años, y aun existiendo importantes diferencias entre ellos, todos tienen como objetivos comunes tanto el estudio comparativo de la eficacia de diferentes antimicrobianos como el estudio de las propiedades farmacocinéticas en relación con la terapia antimicrobiana de estos agentes.

2.1. PERSPECTIVA HISTORICA

Los modelos animales de neumonía se vienen utilizando desde hace muchos años, pudiendo diferenciarse históricamente dos fases. Hasta finales de los años 50, el estudio de las neumonías estaba casi exclusivamente centrado en las causadas por *Streptococcus pneumoniae* y eran producidas por inoculación directa a través de la tráquea de los animales. Entre finales de los 50 y principio de los 60, se desarrollaron técnicas más avanzadas para la inoculación bacteriana de los animales (aerosoles), permitiendo estos métodos la infección simultánea de un

elevado número de ratones. Paralelamente, en estos años se produjo un aumento de la importancia clínica de las neumonías producidas por gramnegativos, empezando así su estudio en modelos experimentales.

Los primeros estudios con modelos de neumonía estaban diseñados para el estudio de la patogénesis de la neumonía, así como para probar la eficacia de antisuecos neumocócicos. En esa época el mayor problema consistía en la dificultad de obtener un modelo reproducible de neumonía, empleándose para ello diversos agentes que aumentaban la virulencia del neumococo. Así lo demuestran las experiencias de Nungester y Jourdanais en 1936 (10), autores de uno de los primeros trabajos sobre el tema, que describen como al inocular a los animales una suspensión de neumococo en un 5% de mucina gástrica, se aumentaba la virulencia bacteriana y así se podían obtener modelos reproducibles de neumonía en ratas. En 1941, Wood (11) describía como el modelo de Nungester y Jourdanais podía ser mejorado simplemente con utilizar cultivos de neumococos en fase exponencial de crecimiento. Así, con este tipo de modelo fue probada la eficacia de las sulfamidas en 1946 por Wood y Irons (12), o de la penicilina en 1956 por Smith y Wood (13).

Posteriormente, como ya se ha dicho, la atención se centró en las bacterias gramnegativas, pasando a un segundo plano las neumonías neumocócicas. Se han utilizado tanto diferentes especies animales (ratones, ratas, conejos, perros,...) como diferentes especies bacterianas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, ...) en estos modelos, obteniéndose interesantes resultados en cuanto a la eficacia comparativa de diversos antimicrobianos.

Actualmente, las neumonías producidas por *Streptococcus pneumoniae* han vuelto a cobrar una gran importancia, debido al grave problema de la aparición de cepas resistentes a la penicilina. Por ello, nuevamente se están diseñando modelos de neumonía neumocócica que tratan de encontrar un tratamiento alternativo eficaz frente a estas cepas resistentes.

2.2.- TIPOS DE MODELO

En la actualidad nos encontramos con varios modelos de neumonía experimental. Las diferencias existentes entre unos y otros residen fundamentalmente en la vía de inoculación y la dosis de microorganismos inoculada, la especie y línea de animal utilizado y el método de seguimiento y cuantificación de la infección producida.

2.2.1. Según vía de inoculación

En función de la vía de inoculación utilizada podemos diferenciar tres grupos:

2.2.1.1. Inoculación intratraqueal

Este método consiste en depositar el inóculo directamente en la tráquea tras su exposición quirúrgica, una vez el animal es anestesiado. La exposición quirúrgica de la tráquea se lleva a cabo en condiciones de máxima esterilidad posible para evitar una infección como consecuencia de la intervención. Dentro de la tráquea y a través de una aguja acoplada a una jeringa se deposita un volumen determinado de la suspensión bacteriana. Posteriormente se sutura la incisión y se coloca al animal en posición vertical para la completa penetración del líquido en el pulmón.

Esta es la técnica tradicionalmente utilizada, siendo su principal ventaja el que se puede obtener un grado homogéneo de infección en todos los animales, ya que se puede precisar tanto la cantidad de inóculo como el tamaño del mismo en cada animal y además se puede asegurar que el inóculo ha entrado en la traquea.

Existen varios autores que siguen esta técnica. Así, hay estudios sobre la eficacia de ceftazidima en el tratamiento de neumonías producidas por *Klebsiella pneumoniae* en ratas (14, 15, 16) o de la patogénesis de *Pseudomonas aeruginosa* en cobayas inmunodeprimidos (17).

2.2.1.2. Inoculación por inhalación con aerosoles

Para este método hay que disponer de un aparato de aerosol. El animal se sitúa a la salida del flujo de aire que lleva una suspensión bacteriana a una determinada concentración.

Este método es el más cómodo y sencillo de todos. Además, tiene las ventajas de que esta forma de inoculación es la que mejor simula la forma natural de transmisión, y además el tejido pulmonar no se ve dañado por la introducción de un volumen anormal de líquido como ocurre con los otros métodos.

Siguiendo este método de inoculación se han hecho estudios de la neumonía producida por *Legionella* en cobayas (18), o los de la eficacia de kanamicina en el tratamiento de neumonía producida por *Klebsiella pneumoniae* en ratones (19).

2.2.1.3. Inoculación por vía orofaríngea

Esta es la técnica descrita por Esposito y Pennington (20, 21), y que consiste en suspender verticalmente al animal una vez anestesiado, y canular la tráquea con un catéter acoplado a una jeringuilla que contiene la suspensión bacteriana a la concentración deseada. Se debe tener seguridad de que la cánula penetra en la tráquea y no en el esófago. Superado este problema, esta técnica mejora a la primera ya que tiene sus mismas ventajas, y además es más sencilla de realizar en cuanto a esfuerzo y a tiempo. Una vez se inocula al animal, este se sitúa primero en posición vertical unos minutos para facilitar que el inóculo penetre en el pulmón.

Posteriormente, otros autores han seguido esta técnica obteniendo interesantes resultados sobre la eficacia de las quinolonas en el tratamiento de las neumonías neumocócicas en ratón (22, 23), o de la eficacia de algunos macrólidos en neumonías producidas por *Haemophilus influenzae* en ratón (24).

2.2.2. Según la especie de animal de experimentación

En lo referente a la especie de animal a utilizar, las diferencias son grandes, utilizándose tanto ratones como ratas, cobayas,... El volumen y el tamaño del inóculo también varía según autores y según el microorganismo empleado. La dosis de antimicrobiano, ruta de administración y frecuencia con que esta se efectúa es otro factor que también varía de unos trabajos a otros. Todo esto hace a veces difícil la comparación de los resultados obtenidos en cada modelo.

2.3. PARAMETROS DE ESTUDIO

En cuanto al método de seguimiento y cuantificación de la infección producida, los parámetros a estudiar pueden ser parte de o todos los siguientes:

- Porcentajes de supervivencia.

- Cálculo de la dosis eficaz 50 y 90 (DE₅₀, DE₉₀).
- Recuento de las UFC/g o ml de pulmón a diferentes tiempos.
- Lesiones anatomopatológicas en pulmón.
- Hemocultivos.
- Farmacocinética: niveles de antibiótico en suero y pulmón.

La utilización de modelos experimentales como los anteriormente descritos ha contribuido indudablemente al conocimiento de la patogénesis de los procesos respiratorios, así como al análisis de los diferentes parámetros que condicionan la resolución de un proceso de infección pulmonar por un determinado antimicrobiano. Así, estos modelos han permitido realizar investigaciones que por razones éticas son imposibles de realizar en humanos o han abierto caminos hacia los ensayos clínicos en voluntarios humanos, siendo siempre el objetivo final el evitar fallos terapéuticos.

3. STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

3.1. INTRODUCCION HISTORICA

Ninguna otra especie de microorganismo patógeno ha sido estudiada tan extensamente como *S. pneumoniae*. El estudio sistemático de sus propiedades como agente de enfermedad humana ha conducido a los más importantes descubrimientos de la biología médica. Aislado por primera vez a partir de la saliva humana por Pasteur en 1881, en Francia, y por Sternberg en los EEUU, su relación con la neumonía lobar fue establecida pocos años después por Fraenkel en Alemania y Weichselbaum en Austria. El reconocimiento de los distintos tipos serológicos de neumococo en 1910 condujo a la obtención de antisueros específicos y, con ello, al primer tratamiento eficaz de la neumonía neumocócica. Siguieron luego las observaciones fundamentales de Avery, Heidelberger y Goebbel sobre la estructura química de los antígenos capsulares y su papel en la virulencia bacteriana. El descubrimiento de que los antígenos capsulares eran carbohidratos tuvo importantes efectos sobre la inmunología como ciencia, puesto que se pensaba que todas las sustancias inmunogénicas eran proteínas. Posteriormente surgieron las observaciones de Griffith, en 1928, relativas a que las células de neumococo de un tipo serológico podían transformarse en células neumocócicas de otro tipo *in vivo*. Avery, MacLeod y McCarty descubrieron que el constituyente químico de las células neumocócicas

responsable de la reacción de transformación es su DNA. Este hallazgo fue la llave que abrió la puerta a la genética molecular y marcó el principio de la actual revolución de los conceptos biológicos.

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

3.2. MICROBIOLOGIA DEL NEUMOCOCO

3.2.1. Morfología

Debido a su apariencia microscópica en forma de cocos ovales o lanceolados asociados típicamente en parejas, los neumococos fueron denominados *Diplococcus pneumoniae* por Weichselbaum, quien llevó a cabo un extenso estudio de la bacteriología de este microorganismo en 1886 (25).

Sin embargo, Sternberg en 1897, expresó su disconformidad con ese nombre, debido a que "este micrococo en algunos medios de cultivo es capaz de formar cadenas de mayor o menor longitud, y es, de hecho, un estreptococo" (26). Experimentos posteriores basados en reacciones de transformación, demostraron la relación de los estreptococos y los neumococos (27, 28), por lo que los neumococos fueron incluidos en el género *Streptococcus* (Rosembach 1884) perdurando el nombre específico de *Streptococcus pneumoniae* hasta nuestros días (Bergey's Manual, 8ª edición) (29).

La morfología microscópica, cocos ovales de 1,2 a 1,8 μm de diámetro mayor y 0,5-1,0 μm de diámetro menor unidos en parejas por su extremo distal, que presentan tinción de Gram positiva en cultivos jóvenes, recubiertos por una cápsula polisacárida que puede teñirse diferencialmente por diversas técnicas (30) fue utilizada como método básico para la identificación de los neumococos en las primeras investigaciones.

Asimismo, la presencia de cápsula, y sobre todo su patogenicidad para conejos y ratones pero no para cobayos, fue también utilizada como método de caracterización.

Actualmente, para diferenciar los neumococos de los estreptococos se realizan varias pruebas de laboratorio, entre las cuales destaca la lisis por bilis o sales biliares (31), la sensibilidad a la optoquina (32), la reacción de quellung (33) y la incorporación de colina (34).

3.2.2. Condiciones de crecimiento

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

En relación con la temperatura, este microorganismo crece entre 25 y 42°C, siendo su temperatura óptima de 37°C, no observándose crecimiento ni a 10°C ni a 45°C. Asimismo crece en un pH comprendido entre 6.5-8.3, siendo el pH óptimo de crecimiento entre 7.4 y 7.8. No se observa crecimiento a pH de 9.6.

Es un microorganismo anaerobio facultativo que presenta una marcada tendencia a acumular peróxido de hidrógeno cuando crece en condiciones aerobias; por ello, crece mejor en una atmósfera que contenga un 10% de CO₂.

Tras incubación en agar sangre o agar chocolate durante 18 horas a 37°C en presencia de 5% de CO₂, aparecen colonias circulares, pequeñas y elevadas, de 0.5-1 mm de diámetro, con una superficie lisa y brillante y con borde entero. Si se realiza una incubación prolongada, la zona central de la colonia se puede deprimir por autólisis. En agar sangre, las colonias se rodean de una zona de lisis eritrocitaria incompleta, denominada hemólisis alfa. La morfología de muchas colonias de neumococo en agar sangre es muy parecida a las colonias hemolíticas alfa de *S. viridans*.

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

Aunque son grampositivos durante la fase exponencial de crecimiento en medios artificiales, se vuelven gramnegativos de modo progresivo al envejecer los cultivos. Si la incubación continúa, disminuye el número de células viables y el cultivo tiende a clarificarse.

Estos cambios se deben a la acción de enzimas autolíticas, que primero transforman las células en gramnegativas y posteriormente causan su lisis.

3.2.3. Pruebas bioquímicas y de identificación

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

PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DE <i>S. PNEUMONIAE</i>			
CRECIMIENTO EN:		FERMENTACION DE:	
- Bilis esculina	→ Negativo	- Esculina	→ Negativo
- 6.5% ClNa	→ Negativo	- Glicerol	→ Negativo
- 5% Sacarosa	→ Negativo	- Inulina	→ Positivo
- 45 °C	→ Negativo	- Lactosa	→ Positivo
- 40% bilis	→ Negativo	- Manitol	→ Negativo
HIDROLISIS DE:		- Celobiosa	→ Positivo
- Arginina	→ Variable	- Rafinosa	→ Variable
FERMENTACION DE:		- Sacarosa	→ Positivo
- Piruvato	→ Negativo	- Sorbitol	→ Negativo
- Arabinosa	→ Negativo	- Trealosa	→ Variable

Tabla1. Pruebas bioquímicas para la identificación de *S. pneumoniae*.

De entre las pruebas bioquímicas enumeradas, la de sensibilidad a la bilis y sales biliares ha sido y es todavía una de las más importantes en la identificación de los neumococos, pero

probablemente, la característica más utilizada para la identificación del neumococo, sea su sensibilidad a la optoquina.

Sin embargo, la prueba que ha ganado una mayor aceptación en la identificación de los neumococos ha sido la prueba de "quellung" descrita por Neufeld en 1902 (33). Esta técnica se utiliza, tanto para la serotipia de cepas, usando sueros monovalentes frente a los 83 tipos descritos, como en la identificación de aislados, para lo cual se utiliza un suero polivalente, denominado OMNI SERUM, que contiene una mezcla de antisueros frente a todos esos tipos.

Otra prueba que debemos mencionar, se basa en la característica de los neumococos de incorporar colina en contraste con los estreptococos (34). Esta técnica ha sido descrita para separar estas especies, cuando las cepas de neumococos son difíciles de identificar al no dar reacciones claras con las pruebas descritas anteriormente.

3.3. ANALISIS ESTRUCTURAL

Los neumococos presentan la estructura clásica de una bacteria gram positiva, siendo su característica más destacada la de estar rodeada por una cápsula de naturaleza polisacárida. Por su localización externa, la cápsula representa el primer componente bacteriano frente al que reaccionan los organismos invadidos, desarrollando anticuerpos específicos.

La cápsula es por ello, la envuelta más estudiada en sus aspectos morfológicos, bioquímicos y fisiológicos. Sin embargo, existen evidencias que indican que otras zonas más profundas de la envuelta celular, podrían estar implicadas en procesos relacionados con la patogénesis del neumococo. Estas envueltas comprenden la pared celular y la membrana citoplasmática, ambas conteniendo estructuras de interés para la fisiología del microorganismo.

3.3.1. Cápsula

Las cápsulas de los neumococos se observan más fácilmente al suspender los organismos capsulados en tinta china. También se vuelven visibles cuando las células son tratadas con el anticuerpo tipoespecífico, el cual, al combinarse con el polisacárido capsular, lo vuelve refráctil (reacción de "quellung"). La palabra "quellung", en alemán, significa hinchazón.

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

Las grandes cápsulas del neumococo tipo 3, de modo parecido a las de ciertos estreptococos hemolíticos del grupo A, se tiñen metacromáticamente (rojo) con azul de metileno.

Las cápsulas neumocócicas están compuestas por grandes polímeros polisacáridos que forman geles hidrófilos en las superficies de los organismos. Estos polisacáridos son antigénicos y forman la base para la separación de los neumococos en 83 serotipos diferentes. La composición química de la cápsula es variable, incluso dentro del mismo serotipo, y así aunque se conocen los componentes glúcidos de muchos de los carbohidratos capsulares tipospecíficos sólo han podido precisarse con exactitud las estructuras de unos pocos (tipos 3, 6 y 8). Por ejemplo, la cápsula de neumococo tipo 3 consiste en unidades repetidas de ácido celobiurónico, disacárido formado por ácido D-glucurónico y D-glucosa conectados por enlaces glucosídicos beta-1,4. El polímero presenta grupos carboxilos libres, lo cual contribuye a la electronegatividad del organismo encapsulado.

Los neumococos, generalmente capsulados, pueden perder la propiedad de formar cápsula por mutación espontánea. Esta alteración se denomina comúnmente "mutación S-R", pues hace cambiar la superficie de las colonias de una textura lisa ("smooth") y brillante S, a otra relativamente rugosa ("rough") R. Cuando ocurre esta mutación, se produce una pérdida de virulencia frente al animal huésped, normalmente susceptible. Se ha demostrado que los mutantes desprovistos de cápsula (avirulentos) son captados y destruidos por los fagocitos con más facilidad que las células capsuladas de tipo salvaje (virulentas) (35), y esto determina su incapacidad para producir una infección eficaz.

Se ha establecido una relación cuantitativa entre el tamaño de la cápsula y la virulencia de los neumococos (36). Así, los neumococos tipo 3 que producen cápsulas muy grandes son generalmente los más virulentos para los animales de laboratorio y el hombre. Las denominadas "variantes intermedias" de neumococo que producen cápsulas de tamaño subnormal son menos virulentas que las variantes lisas, pero más que las variantes rugosas de la misma cepa.

3.3.2. Pared celular

El neumococo posee una pared celular típica de las bacterias grampositivas, compuesta fundamentalmente por peptidoglicano (también denominado mureina) y ácidos teicoicos.

3.3.3. Membrana citoplasmática

En la membrana citoplasmática se encuentran localizadas proteínas a las que se atribuyen actividades enzimáticas importantes, tales como autolisinas, endonucleasas, proteínas activadoras e inhibitoras y proteínas fijadoras de penicilina (PBPs o penicilin binding proteins) (37, 38, 39).

Otro componente superficial importante que se fracciona con la membrana citoplasmática es el antígeno de Forssman (40, 41, 42), cuyo papel y composición se detallará más adelante.

3.4. ANALISIS ANTIGENICO

3.4.1. Antígenos capsulares

Desde antiguo se ha admitido que el comportamiento antigénico de los neumococos intactos, en su estado normal, estaba determinado por la naturaleza de las cápsulas que rodeaban las células bacterianas.

Se realizó un gran avance en el estudio de la estructura antigénica del neumococo, y de las bacterias en general, cuando Avery y Morgan (43) y Avery y Heidelberger (44), estudiaron el tema desde el punto de vista químico. Mediante métodos de extracción, seguidos de precipitación fraccionada, fue posible separar los componentes capsulares que determinan la tipo-especificidad, en un estado de pureza química. Estos componentes se identificaron como polisacáridos complejos y se determinaron algunas de las características químicas y físicas de los polisacáridos capsulares de los tres tipos clásicos.

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

reacción de quellung o por pruebas de precipitación realizadas con un extracto de las cápsulas neumococales.

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

3.4.2. Antígenos no capsulares

Polisacárido C: El polisacárido capsular no es, de hecho, el único constituyente antigénico del neumococo. En 1930, se aisló otro componente que presentaba todas las reacciones usuales de un polisacárido, no se inactivaba por digestión péptica o trípica, y producía en hidrólisis, alrededor de un 30% de azúcares reductores, y contenía un 6.1% de nitrógeno. Sin embargo, difería del polisacárido capsular en que contenía ácido fosfórico. No era tipo-específico, pero parecía caracterizar al neumococo como especie. Se le designa como "polisacárido C" o somático, y se parece en algunos aspectos a los antígenos grupo específicos de los estreptococos hemolíticos.

Este carbohidrato especie-específico es el mayor componente estructural de la pared celular de todos los neumococos. El polisacárido C es un polímero de ácido teicoico conteniendo fosfocolina como determinante antigénico mayoritario. La fosfocolina es la responsable de la aglutinación de los neumococos por ciertas proteínas del mieloma (45) y de la interacción del polisacárido C con una beta-globulina del suero en presencia de calcio; esta beta-globulina llamada "proteína C reactiva" (46) no es un anticuerpo sino una proteína que en la sangre normal se encuentra presente en baja concentración, pero su concentración es elevada en la sangre de pacientes con enfermedades inflamatorias agudas. La unión de la proteína C reactiva al polisacárido C, puede activar el complemento y mediar la fagocitosis.

El polisacárido C, además de fosfocolina, contiene N-acetil-galactosamina, glucosa, fosfato, ribitol y diaminotriデオキシhexosa.

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

El antígeno F se parece, en gran número de propiedades físico-químicas y fisiológicas, a los ácidos teicoicos de membrana de bacterias Gram (+) (41), y esto sugiere que el antígeno F, con una estructura química compleja, pueda considerarse un equivalente funcional de los más convencionales ácidos teicoicos de membrana.

El antígeno F es un potente y altamente específico inhibidor de la autolisina homóloga, la cual es una enzima ácido-N-acetil-murámico-L-lisina amidasa (47). El hecho de que el antígeno F sea un potente inhibidor de la autolisina, sugiere un papel fisiológico específico de los ácidos lipoproteicos en la regulación "in vivo" de la actividad hidrolasa de mureina en el organismo. Además, el antígeno F realiza también una importante función en los procesos de adherencia bacteriana.

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

3.5. VIRULENCIA Y DEFENSAS DEL HUESPED

Es bien conocida la colonización por *S. pneumoniae* de las membranas mucosas del tracto respiratorio superior (48), y ello tiene relación indudablemente con la existencia de una gran proporción de portadores entre los individuos sanos. Es indudable que se produce una penetración en los tejidos desde los lugares de colonización en las membranas mucosas, pero su mecanismo de acción aún es oscuro. A pesar de esto, está comenzando a conocerse la influencia de los factores de virulencia de estos microorganismos y de las defensas del huésped. Pueden contribuir a la virulencia algunos agentes tóxicos producidos por *S. pneumoniae*, así por ejemplo, los neumococos producen una toxina hemolítica, denominada neumolisina, la cual está inmunológicamente relacionada con las hemolisinas O oxigenolábiles de los estreptococos hemolíticos, *Clostridium tetani* y *Clostridium welchii*. También liberan, durante la autólisis, una *sustancia productora de lesiones purpúricas* que causa hemorragias cutáneas e internas cuando se inyecta a los conejos (36).

No obstante, la virulencia de los neumococos no depende directamente de los factores tóxicos, sino de la cápsula de polisacáridos que interfiere con la fagocitosis. La pérdida de la cápsula da lugar a neumococos susceptibles a la fagocitosis y, por tanto, avirulentos.

La resistencia del huésped a la infección depende de la rapidez con que las células fagocíticas eliminan al microorganismo invasor ya que los *S. pneumoniae* son destruidos rápidamente después de la ingestión. Por tanto, la resistencia del huésped depende de la activación del sistema de complemento (49), ya que este promueve a su vez la fagocitosis.

En el huésped susceptible, los ácidos teicoicos de la pared celular del neumococo activan la vía alternativa del complemento; es probable que los polisacáridos neumocócicos no sean capaces de activar esta vía. En los huéspedes inmunes, los neumococos activan la vía clásica al ser sensibilizados por anticuerpos dirigidos contra su sustancia capsular. Dado que la activación de la vía clásica requiere anticuerpos específicos capsulares, esta se produce relativamente tarde durante la enfermedad, después de haber comenzado la síntesis del anticuerpo o tras una infección posterior con el mismo tipo capsular.

Independientemente de la vía activada, el componente C3b del complemento es el factor activo que promueve la fagocitosis, pero su eficacia a este respecto depende de ciertas variables, siendo la más importante la localización del C3b sobre la superficie bacteriana. Cuando el C3b se activa por la vía alternativa, se fija al parecer a la superficie subcapsular de la bacteria. En este lugar, la cápsula actúa como una barrera física para el reconocimiento del C3b por los fagocitos, y el efecto de la opsonización por dicho factor disminuye o se pierde. Por otra parte, la activación de la vía clásica da como resultado la producción de C3b, que se asocia junto con el anticuerpo a la superficie capsular, donde es reconocido por los fagocitos al tiempo que se provoca la ingestión (50). Por tanto, la activación de la vía clásica por anticuerpos capsulares específicos es mucho más efectiva que la inducción de la opsonización y, sirve como base teórica para la inmunización. La activación de la vía alternativa es menos eficaz en este sentido, pero puede promover la fagocitosis si se forman grandes cantidades de C3b. Existen diferencias con respecto a las distintas cepas de neumococos, de modo que las que inducen la producción de cantidades mayores de C3b son opsonizadas con una eficacia mayor y, por tanto, son menos virulentas.

Hay que destacar los posibles efectos de las respuestas del huésped sobre la patogénesis de las infecciones neumocócicas. Como ya se ha mencionado, estas infecciones se caracterizan por una reacción toxémica aparente. Se cree, aunque no se ha demostrado, que la activación del complemento y la acción de las células fagocíticas podría dar lugar a una lesión inflamatoria del tejido; la activación de los componentes C3a y C5a, por ejemplo, estimula la liberación de histamina y serotonina. El C5a es también quimiotáctico y estimula en los neutrófilos la liberación de enzimas y de metabolitos oxigenados tóxicos; estas sustancias se liberan también

durante la ingestión de las células bacterianas. Por tanto, existe la posibilidad de que se produzcan lesiones tisulares durante los procesos que acompañan a las respuestas defensivas del huésped frente a las infecciones neumocócicas (51).

3.6. CLASIFICACION SEROLOGICA

El principal método de clasificación de los neumococos se basa en la detección de antígenos polisacáridos de la cápsula mediante pruebas serológicas, de las cuales la más utilizada es la denominada "quellung" o prueba de hinchazón de la cápsula, aunque también se pueden utilizar otras técnicas serológicas tales como aglutinación, co-aglutinación, contraelectroforesis, etc.

Existen diferentes clasificaciones serológicas para el neumococo, como la americana o como la clasificación danesa o europea que está basada en las interrelaciones antigénicas (52). En la clasificación danesa existen 46 tipos y grupos (del 1 al 48, ya que el 26 y 30 no existen por razones históricas).

3.7. INFECCION NEUMOCOCICA

Los neumococos se encuentran formando parte de la flora normal del tracto respiratorio humano en el 5 al 60% de la población según las diferentes estaciones del año. La susceptibilidad a la infección suele estar provocada por una serie de factores de predisposición entre los que se incluyen la edad avanzada, existencia de inmunodeficiencias, nutrición inadecuada, exposiciones graves o repentinas al frío, fatiga, consumo de alcohol, diabetes, procesos infecciosos víricos como gripe, adenovirus y fiebre Q, procesos broncopulmonares crónicos tributarios de respiración asistida, y ciertas enfermedades como síndrome nefrótico, Hodgkin y mieloma múltiple.

Los neumococos son el principal agente productor de neumonía en el hombre y son un patógeno meníngeo importante, diseminándose en ambos casos por vía sanguínea, produciendo infección sistémica. También causan infecciones locales como la otitis media, mastoiditis, sinusitis paranasal o conjuntivitis.

3.7.1. Neumonía

El neumococo es la causa del 40-80% de las neumonías bacterianas de la comunidad, teniendo un papel muy inferior en las neumonías hospitalarias. Por lo general, se producen por aspiración, precedidas de infecciones de las vías respiratorias altas y pocas veces por vía linfática o hemática, pudiendo provocar complicaciones importantes como consecuencia de su diseminación local o por vía hematogena, ocasionando incluso la muerte, la cual suele ocurrir en las fases precoces de la infección.

La lesión más frecuente en los adultos, suele ser de distribución lobar, aunque en niños y ancianos es habitual que se produzca bronconeumonía, caracterizada por afectaciones diseminadas. La imagen radiológica del pulmón, revela una densidad homogénea en el área afectada, pudiendo ocupar uno o varios lóbulos enteros.

El cuadro clínico se inicia bruscamente con escalofríos, fiebre, tos, punta de costado, disnea y emisión de un esputo herrumbroso, en el que se observan hematíes, leucocitos polinucleares y diplococos grampositivos capsulados. En el 20-25% de los casos de pacientes no tratados, se produce bacteriemia, permaneciendo los cultivos positivos para neumococo durante los 3 ó 4 primeros días de la enfermedad.

Con frecuencia, el curso clínico de la enfermedad puede verse modificado por complicaciones en el mismo pulmón (atelectasia, retraso en la resolución, abscesos), en estructuras adyacentes (efusión pleural, empiema, pericarditis), o en estructuras más lejanas (artritis, endocarditis, parálisis del íleo y alteraciones de la función hepática).

3.8. SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS

El tratamiento de la neumonía neumocócica se ha basado durante casi 40 años, en la utilización de la penicilina, debido a la sensibilidad inicial de los neumococos a este antibiótico. Sin embargo, la aparición de cepas resistentes a penicilina, ha alterado notablemente la situación en los últimos años, por lo que hoy día resulta necesario la realización de antibiogramas cuando se aíslan neumococos en relación con infecciones graves.

Ya a principios de los años 40, se habían aislado en el laboratorio cepas de neumococos resistentes a penicilina (53, 54), pero hasta 1967 en Australia no se describió el primer aislado clínico resistente, el cual resultó ser de resistencia intermedia a penicilina (0.6 µg/ml) y

tetraciclina (5 µg/ml) (55). En 1971 en Nueva Guinea, fueron descritos más casos de resistencia (56), en 1974, un 12% de 518 aislados de Nueva Guinea eran resistentes a penicilina (57), y en 1980 un tercera parte de los aislados eran resistentes (58).

El primer caso de infección producida por un neumococo resistente en EEUU, se produjo en 1974 (59). En 1977 ocurrió en Suráfrica (60) un importante brote con varias muertes en niños hospitalizados; los neumococos aislados eran altamente resistentes a penicilina (CMI = 4-8 µg/ml), presentando además resistencias múltiples. Estas cepas se extendieron posteriormente a otros hospitales surafricanos. A partir de este brote se intensificó la investigación sobre resistencias, que se han ido describiendo en numerosos países tanto desarrollados como en vías de desarrollo (61).

En Europa, España es el país en el que el índice de resistencias del neumococo es más elevado, seguido de cerca por Hungría y Polonia (62, 63).

Además de a la penicilina, los neumococos han desarrollado resistencias a otros antimicrobianos como la tetraciclina, sulfamidas, eritromicina, cloranfenicol, ... siendo frecuente la presencia de resistencias múltiples (64, 65).

3.9. INMUNIDAD. VACUNAS

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

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

enfermedades provocadas por estos tipos. Aunque con algunas reservas, la creencia general es que la vacuna ofrece una protección contra los graves efectos de las enfermedades neumocócicas en ciertos grupos de riesgo (guarderías, enfermedades crónicas, alcoholismo, leucemia, ...).

4. ANTIMICROBIANOS

El ideal terapéutico perseguido desde la aparición de los primeros antibióticos, ya fue planteado por el fundador de la quimioterapia, Ehrlich (1913), quien postuló (66) que la eficacia de un agente quimioterápico debe basarse en los siguientes puntos:

- 1°.- Ser fuertemente activo contra los microorganismos.
- 2°.- Ser fácilmente absorbible por el cuerpo.
- 3°.- Ser activo en presencia de tejidos o fluidos corporales.
- 4°.- Poseer un bajo grado de toxicidad y, por tanto, un alto índice terapéutico.
- 5°.- No permitir el desarrollo de resistencias en los microorganismos.

Desde entonces, los logros y éxitos han sido muchos, consiguiendo la medicina uno de los mayores avances en su historia, pero pese a ello, todavía no se ha podido encontrar el antibiótico ideal que cumpla todos los postulados arriba mencionados, con lo que la investigación en este campo sigue presentando muchos retos y metas que alcanzar y superar.

El punto de partida de la historia de la investigación antimicrobiana se sitúa en la aparición de la sulfanilamida hacia 1909. El posterior descubrimiento de la penicilina en 1929 por Alexander Fleming, y su posterior aislamiento y purificación en 1940 por Chain y su equipo, se consideró como el avance necesario para que los investigadores tomaran en serio la búsqueda de nuevas sustancias que pudieran tener actividad contra otros microorganismos.

Inicialmente, la principal fuente de sustancias antibióticas fueron las bacterias pertenecientes al grupo de *Streptomyces*, del cual se han obtenido antibióticos como la estreptomina, el primero activo frente a bacilos gramnegativos aerobios. A partir de muchas de estas sustancias obtenidas naturalmente se han logrado otras nuevas por transformación química, los antimicrobianos semisintéticos, que aventajan a las primeras en algunos puntos como el espectro de acción o su mejor farmacocinética. Posteriormente, apareció otro grupo de antimicrobianos producidos por síntesis química, tales como el ácido nalidixico y oxolónico, etambutol, etc., que revolucionaron y dieron un nuevo empuje a la investigación en este campo.

La clasificación de los antimicrobianos se puede realizar principalmente teniendo en cuenta criterios de estructura química o criterios de modo de acción (67). Respecto a los mecanismos de acción, todavía existen muchos puntos oscuros que resolver, pese a la inestimable ayuda que el avance de algunas ciencias, como la genética o la bioquímica molecular, ha supuesto.

Con la aparición de los fenómenos de resistencia a los antimicrobianos en uso, también se empezaron a estudiar los mecanismos de resistencia de los microorganismos a estos compuestos, tema de la máxima actualidad hoy en día (68, 69, 70, 71).

4.1. BETALACTAMICOS

El término β -lactámico incluye a todas las moléculas que contienen en su estructura un anillo β -lactámico, pudiendo ser naturales o semisintéticos, con actividad principalmente bactericida, y de corto, medio o amplio espectro.

Este fue el primer grupo de sustancias antimicrobianas que se desarrolló, comenzando este desarrollo con el descubrimiento realizado por Fleming en 1929 de la penicilina (72), y su aislamiento posterior por Chain y cols. en 1940 de la penicilina pura y su preparación a escala industrial (73). En 1949, Florey y cols. (74) publicaban una revisión de la química y producción de la penicilina G, y hacían unas primeras especulaciones sobre su forma de acción.

Desde entonces, han aparecido muchas nuevas moléculas β -lactámicas en el mercado y actualmente podemos clasificar los β -lactámicos en varios grupos: Penemas o penicilinas, Penemas, Carbapenemas, Clavamas, Cefemas y cefamicinas, Oxacefemas u oxalactamas y Acetidinonas. De todos estos grupos nos centraremos en el de las penicilinas y en el de las clavamas por pertenecer a ellos amoxicilina y ácido clavulánico respectivamente.

4.1.1. PENICILINAS

4.1.1.1. Estructura química

Estructuralmente las penicilinas resultan de la condensación de un anillo betalactama (anillo principal) y otro de tiazolidina (anillo secundario), compuesto fundamental denominado

ácido 6-amino-penicilánico (6-APA) reflejado en la figura 1, que los hongos productores fabrican posiblemente por la unión de dos aminoácidos, la valina y la cistina.

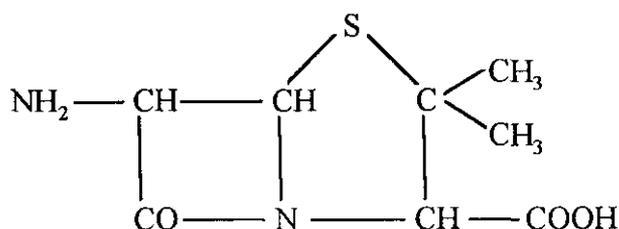


Figura 1

Es necesaria para la actuación de las penicilinas la presencia de dicho ácido con su estructura íntegra, sin la ruptura del puente C=O betalactámico clave y límite necesario para mantener su acción antibiótica. Unido a este núcleo betalactámico y en posición 6, portan un grupo amido ligado a un radical ácido, conocido como cadena lateral de las penicilinas; la estructura química de esta cadena es la que distingue su espectro antibacteriano, ácido-resistencia, sensibilidad o resistencia a las penicilinasas y capacidad de absorción oral. Por otra parte, el radical carboxilo unido al anillo tiazolidínico da lugar, según se neutralice con sodio o potasio o se esterifique por sustancias orgánicas, a la mayor o menor solubilidad total del preparado y, en ciertos casos, condiciona también su absorción.

4.1.1.2. Clasificación

Los numerosos derivados del 6-APA se pueden clasificar en función de su estructura química o en base a su actividad antibacteriana. En base a lo primero, y atendiendo a la función del radical en posición 6, se distinguen tres grupos de penicilinas que quedan reflejados a continuación (75):

I. ACIL-AMIDO PENICILINAS

1.- Penicilinas naturales

1.a.- Penicilina G

1.b.- Penicilina V

2.- Penicilinas semisintéticas

- 2.a.- Análogos de la penicilina V: feneticilina, propicilina, etc.
- 2.b.- Análogos de la penicilina G: clometocilina.
- 2.c.- Estables frente a la penicilinasa estafilocócica: meticilina, oxacilina, cloxacilina, etc.
- 2.d.- Aminopenicilinas: ampicilina, amoxicilina, etc.
- 2.e.- Amplio espectro y activas frente a *P. aeruginosa*: carboxipenicilinas, sulfopenicilinas y sulfoaminopenicilinas.

II. ACIL-UREIDO PENICILINAS

Semisintéticas, de amplio espectro y activas frente a *P. aeruginosa*: azlocilina, mezlocilina, piperacilina.

III. AMIDINO PENICILINAS

Semisintéticas, de amplio espectro y no activas frente a *P. aeruginosa*: mecilnam.

4.1.1.3. Mecanismo de acción

Las penicilinas, y en general todos los β -lactámicos, interfieren la formación de la pared celular bacteriana. La pared celular que envuelve las células bacterianas está formada por peptidoglicano que consta de péptidos de cadena corta que se enlazan y unen a un largo polímero polisacárido constituido por unidades alternas de ácido N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico con uniones de tipo glicosídico β -(1, 4), estando el grupo carboxilo del ácido murámico generalmente sustituido por una cadena peptídica de aminoácidos D- y L-. Las uniones cruzadas tienen lugar bien directamente (organismos gramnegativos) o mediante un puente interpeptídico (organismos grampositivos) entre el residuo diamino en posición 3 de la cadena peptídica y D-ala en posición 4 de la subunidad peptídica adyacente. En las bacterias grampositivas, el peptidoglicano está directamente unido por enlaces covalentes al ácido teicoico o al ácido teicurónico. En las bacterias gramnegativas, el peptidoglicano está unido de forma covalente a una membrana externa lipoproteica (76, 77).

La unión cruzada con eliminación del D-ala terminal se denomina reacción de transpeptidación, las enzimas que catalizan esta reacción son las principales dianas de los antibióticos β -lactámicos. La eliminación del D-ala terminal es función de las carboxipeptidasas,

enzimas también sujetas a la inhibición por β -lactámicos. La transglicosilación que es responsable de la polimerización de la cadena de glicano en peptidoglicano no es sensible a los β -lactámicos (78).

Las dianas celulares para los antibióticos β -lactámicos son los enzimas que catalizan la síntesis de las uniones cruzadas de peptidoglicano de la pared celular. Estos enzimas son proteínas fijadoras de penicilina (“penicillin binding proteins” o PBPs). Se han descrito ocho PBPs localizadas en la membrana interna de la pared celular o en la membrana citoplasmática (79).

Los compuestos β -lactámicos tienen diferentes afinidades para varias PBPs y dependiendo de su unión específica a una PBP tienen diferentes efectos sobre las bacterias. Así por ejemplo, la inactivación de algunas PBPs (PBP 1A, 1B, 2 y 3) provoca la muerte de la célula bacteriana. Por el contrario, otras PBPs (PBP 4, 5 y 6) no son esenciales para la viabilidad de la bacteria y su inactivación por moléculas de β -lactámicos no es letal para la bacteria (80, 81).

Como consecuencia de la interferencia de los β -lactámicos en la formación de la pared celular, esta queda laxa, incompleta y muy susceptible al estallido y ruptura debido a las altas presiones osmóticas ejercidas por el citoplasma (75). Además, se ha visto (82) que en *S. pneumoniae* los β -lactámicos inducen la liberación del ácido lipoteicoico, el cual actúa como un inhibidor del sistema autolítico, lo cual permite una actividad incontrolada de las autolisinas (mureína hidrolasas) que conlleva una destrucción de pared celular seguida de una lisis celular. Este mecanismo puede actuar en otros microorganismos (83).

4.1.1.4. Penetración

Los β -lactámicos penetran a través de la membrana externa y del peptidoglicano por poros OmpF y OmpC en el caso de las bacterias gramnegativas, ya que en estas la membrana externa actúa como una barrera hidrófoba, impidiendo el paso de sustancias hidrofílicas (84). Una vez recorrido el espacio periplásmico, se fijan sobre el lugar de acción (las PBPs). En el caso de los grampositivos, al no poseer membrana externa, los β -lactámicos atraviesan el peptidoglicano hasta fijarse a las PBPs (83).

4.1.1.5. Mecanismos de resistencia

La resistencia a las penicilinas puede ser debida a varios mecanismos:

1.- **Alteraciones en la permeabilidad celular.** Este mecanismo no se ha observado en grampositivos, mientras que ha sido ampliamente descrito en gramnegativos (85, 86, 87). Las alteraciones se producen en porinas o en lipopolisacáridos asociados a la membrana externa, impidiendo el paso de las moléculas. Esta disminución de la permeabilidad sólo produce resistencias moderadas.

2.- **Modificaciones de la diana.** Se han observado alteraciones en las PBPs producidas por mutaciones, disminuyéndose la afinidad de los β -lactámicos por estas proteínas. Normalmente se modifican las PBPs esenciales, como la 1, 2 y 3. Este mecanismo se ha descrito tanto en grampositivos como en gramnegativos, y la mayoría de los microorganismos que la presentan no son productores de β -lactamasas (88, 89, 90), siendo este el caso de *S. pneumoniae*.

3.- **Producción de β -lactamasas.** Son enzimas producidas por las bacterias que hidrolizan el enlace amida cíclico del núcleo de la penicilina, lo que conduce a la producción de peniciloatos sin actividad bacteriana. Las β -lactamasas pueden estar codificadas cromosómicamente o por plásmidos de resistencia. Las primeras pueden ser agrupadas en las clases I y II de Richmond que corresponden a las cefalosporinasas y penicilinasas respectivamente, mientras que las segundas pueden agruparse en β -lactamasas de amplio espectro, llamadas tipo TEM y aquellas que hidrolizan más rápidamente oxacilina (OXA 1, 2 y 3), carbenicilina (PSE 1, 2, 3, 4) que corresponden a las clases III y V respectivamente. Estos tipos producen mayor resistencia a penicilinas que a cefalosporinas. Por último, la clase IV de β -lactamasas de amplio espectro, son enzimas codificadas cromosómicamente, por ejemplo, SHV-1 y HMS-1 (91).

En los organismos grampositivos, las β -lactamasas se segregan extracelularmente, su síntesis está mediada por plásmidos y la mayoría de los enzimas son inducibles (92), mientras que en los gramnegativos se localizan en el espacio periplásmico de la bacteria, y tienen origen cromosómico o bien plasmídico (93).

4.- **Tolerancia.** Se ha observado para algunos β -lactámicos y se refleja por un aumento de la CMB aunque la CMI permanece constante. Las bacterias se inhiben en su crecimiento pero el antibiótico no produce acción bactericida. Puede ser debido a un déficit de mureína hidrolasa

por mutación o por persistencia del represor, faltando entonces el mecanismo bacteriolítico. Este fenómeno aparece en *S. pneumoniae* entre otros microorganismos (94, 95, 96).

4.1.1.6. Farmacocinética

La absorción oral varía mucho para las diferentes penicilinas, pero las concentraciones séricas máximas se alcanzan 1-2 horas después de la ingestión. Difunden fácilmente, alcanzando valores terapéuticos en los líquidos extracelulares y en la mayor parte de los tejidos corporales a excepción del humor acuoso, la próstata y las meninges no inflamadas. No penetran intracelularmente ni en el interior de los polimorfonucleares. La unión a proteínas (especialmente a la albumina) oscila del 17% al 97% dependiendo de que penicilina se trate, y tienen una vida media corta que oscila entre los 30-70 minutos.

Se eliminan principalmente por vía renal mediante filtración glomerular y secreción tubular (75, 97).

4.1.1.7. Efectos secundarios y toxicidad

Los efectos más comunes que pueden aparecer son trastornos digestivos como diarreas, náuseas, vómitos, etc, alteraciones hematológicas como anemia hemolítica, alteraciones neurológicas como hiperreflexia, mioclonias e irritabilidad muscular, y alteraciones de la función renal o hepática. Además, pueden ocasionar reacciones alérgicas que van desde el prurito y la urticaria hasta el shock anafiláctico (75, 97).

4.1.1.8. Indicaciones

Su administración está indicada, siempre y cuando no existan resistencias, para el tratamiento de infecciones cutáneas y de tejidos blandos (heridas, absesos, etc.), infecciones respiratorias (bronquitis, neumonías, etc.), infecciones otorrinofaríngeológicas (faringitis, otitis, sinusitis, etc.), infecciones genitourinarias (gonococia, sífilis, cistitis, etc), infecciones osteoarticulares, endocarditis, septicemias, meningitis, salmonelosis, fiebre reumática, y demás infecciones causadas por microorganismos sensibles a ellas (75, 97).

4.1.2. CLAVAMAS

Son derivados del ácido 6-aminopenicilánico que carecen del átomo de azufre en la posición 1 del anillo secundario de tiazolidina, y en su lugar poseen uno de oxígeno (O), por lo que dicho anillo es en realidad una oxazolidina; además está ausente la cadena lateral acil-amino en posición 6.

Su nombre deriva del primer compuesto descrito, denominado ácido clavulánico, obtenido a partir de un cultivo de *Streptomyces clavuligerus*. El ácido clavulánico tiene poca actividad antibacteriana, pero es un potente inhibidor de las betalactamasas producidas por muchos microorganismos; su acción bloqueante de estas enzimas es irreversible y progresiva, de forma que, pequeñas concentraciones del fármaco impiden la acción inactivante de las mismas sobre las penicilinas no resistentes a ellas, con lo que su asociación resulta intensamente sinérgica (75).

4.1.3. AMOXICILINA/ACIDO CLAVULANICO

La amoxicilina es una penicilina semisintética de amplio espectro que muestra un elevado nivel de actividad bactericida frente a una amplia gama de bacterias grampositivas y gramnegativas, pero que es inestable ante betalactamasas bacterianas (98, 99, 100). El ácido clavulánico es un inhibidor progresivo de las betalactamasas bacterianas (101, 102) y es capaz de proteger a la amoxicilina de su destrucción, "in vitro" e "in vivo" (103, 104). En la actualidad, existen fórmulas comerciales en uso que reúnen la amoxicilina y la sal potásica del ácido clavulánico, en proporciones de 2:1, 4:1 y 10:1.

4.1.3.1. Estructura química

Amoxicilina es el nombre con el que se conoce al trihidrato del ácido 6 ((amino (4-hidroxifenil) acetil) amino)- 3,3 - dimetil - 7 - oxo - 4 - tia - 1 - azabicyclo (3.2.0.) heptano 2 carboxílico (Figura 2).

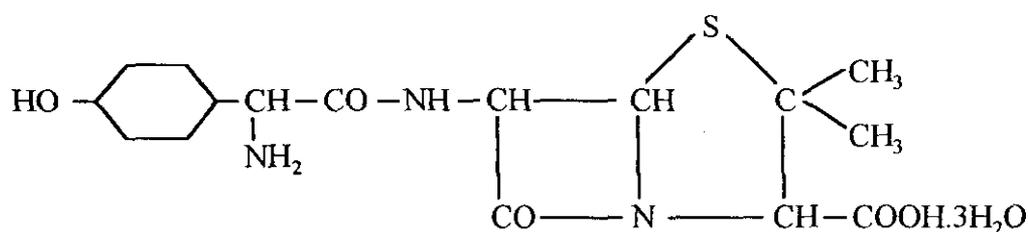


Figura 2

La sal potásica del ácido Z - (2R,5R) - 3 (2-hidroxietiliden) - 7 - oxo - 4 - oxa - 1 - azabicyclo (3.2.0.) - heptano - 2 - carboxílico es conocida como la sal potásica del ácido clavulánico (Figura 3).

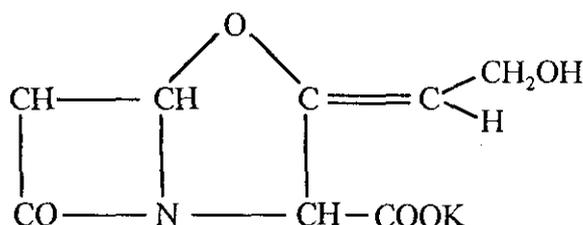


Figura 3

4.1.3.2. Actividad antibacteriana

El ácido clavulánico por si solo muestra un nivel relativamente bajo de actividad antibacteriana, tanto frente a las bacterias grampositivas como a las gramnegativas. La actividad de amoxicilina en presencia de ácido clavulánico, frente a las cepas susceptibles, no varía respecto a la que se obtiene sólo con amoxicilina. En cambio, en cepas productoras de betalactamasas (tanto grampositivos como gramnegativos) la presencia de ácido clavulánico aumenta significativamente la sensibilidad de esas cepas a la amoxicilina (105, 106). Sólo ciertos bacilos gramnegativos productores de betalactamasas cromosómicas de la Clase I de Richmond, como *Enterobacter spp.* y *Pseudomonas aeruginosa*, son poco sensibles a la adición de ácido clavulánico a la amoxicilina, ya que estas betalactamasas no se inhiben fácilmente por el ácido clavulánico (107).

Los microorganismos que presentan otros mecanismos de resistencia a la amoxicilina, no son sensibles a la combinación de amoxicilina y ácido clavulánico.

4.1.3.3. Factores que influyen en la actividad de amoxicilina/ácido clavulánico

La actividad de amoxicilina/ácido clavulánico puede verse afectada tanto “in vitro” como “in vivo” por alguno de estos factores:

- **Medio de cultivo:** En general, la actividad de amoxicilina/ácido clavulánico no se ve afectada por la composición de los medios de cultivo bacteriológicos más comúnmente empleados, y sólo se ve reducida cuando se utilizan medios selectivos o suplementados que contengan azufre (105).

- **pH:** Los cambios en el pH del medio de cultivo no afectan a la actividad del compuesto (105). Amoxicilina es relativamente ácido-estable (97).

- **Suero:** Ni la amoxicilina (18%) ni el ácido clavulánico (25%) se unen en proporción elevada a las proteínas humanas séricas, por lo que su actividad no se ve afectada significativamente por la presencia de suero (105).

- **Inóculo:** La actividad de amoxicilina en presencia de ácido clavulánico no se modifica de manera notable por inóculos grandes (105).

4.1.3.4. Indicaciones

Amoxicilina/ácido clavulánico está indicado en el tratamiento de los procesos infecciosos producidos por microorganismos productores de betalactamasas y de los procesos infecciosos mixtos producidos por microorganismos sensibles a la amoxicilina y por microorganismos productores de betalactamasas tales como infecciones del aparato respiratorio, otitis media, infecciones genitourinarias, infecciones de la piel, tejidos blandos y óseos e infecciones intraabdominales.

4.1.3.5. Farmacocinética

La farmacocinética de amoxicilina y ácido clavulánico es parecida, alcanzándose niveles séricos máximos de ambos, alrededor de una hora después de la administración. Tiene una absorción oral prácticamente completa. La unión a proteínas es baja, 18% y 25% respectivamente, y la principal vía de eliminación es por excrección renal.

4.2. QUINOLONAS

El desarrollo de este grupo de sustancias fue lento, y se inició en 1962 con el descubrimiento al azar del ácido nalidíxico durante el proceso de purificación de la cloroquina (108, 109). Su espectro de actividad “in vitro” era reducido, limitado a bacterias aerobias gramnegativas, con un perfil farmacocinético desfavorable, limitándose su uso terapéutico en infecciones del tracto urinario. Una década más tarde aparecieron otros dos compuestos, el ácido oxolínico y la cinoxacina, los cuales también se vieron limitados al tratamiento de las infecciones de las vías urinarias. Más tarde, aparecieron otras moléculas, como el ácido pipemídico y la rosoxacina, con un radical piperazinil en posición 7 que confiere a la molécula actividad sobre *Pseudomonas*. Poco tiempo después se produjo un rápido avance en el desarrollo de otras quinolonas, las nuevas fluoroquinolonas que cuentan con un átomo de flúor en la posición 6, que aumenta su actividad antibacteriana y amplía su espectro de acción, llegando a comprender los grampositivos. Estas moléculas, en comparación con las más antiguas, son más activas y más bactericidas, por lo que son suficientes dosis más bajas para el tratamiento. Se absorben por vía oral en grado variable, según el compuesto, alcanzándose concentraciones séricas moderadas. Los efectos tóxicos son menores que los producidos por el resto.

4.2.1. Estructura química

Las quinolonas son sustancias bicíclicas que, como se puede ver en la figura 1, tienen en común una estructura central constituida por un anillo 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína, utilizando el término abreviado de 4-quinolona para designar a la quinolona sustituida (110).

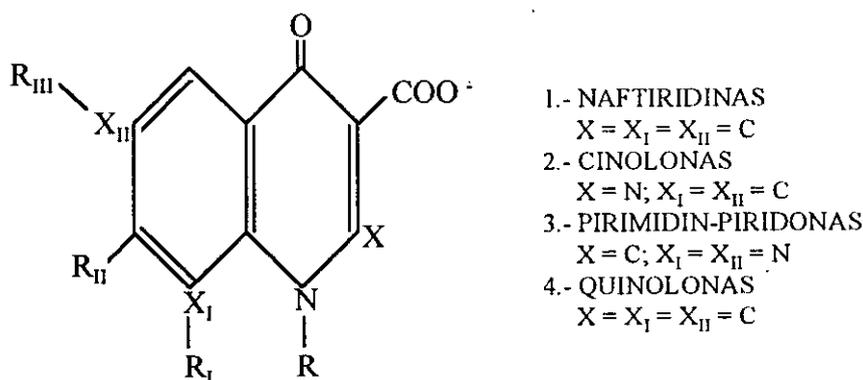


Figura 4

A esta molécula puede incorporarse una serie de radicales y sustituciones que influyen de forma importante en sus características y propiedades (111, 112, 113). El radical carboxilo de la posición 3 y el grupo cetónico de la posición 4 son totalmente imprescindibles para ejercer su actividad antibacteriana, ya que son necesarios para la unión a la ADN girasa.

Las diferencias estructurales entre las distintas quinolonas radican tanto en el número y posición de los átomos de nitrógeno como en las cadenas laterales y la presencia de flúor en su molécula. Las sustituciones en la posición 1 influyen en la afinidad por la ADN girasa y, por tanto, en la actividad antibacteriana general. Las sustituciones en la posición 2 afectan a las propiedades farmacocinéticas. El grupo amino en posición 5 incrementa la actividad "in vitro" y favorece la absorción. La introducción de un átomo de fluor en posición 6 da lugar a un incremento en la inhibición de la ADN girasa, potenciando la penetración en el interior de la bacteria, originando una mayor acción antibacteriana sobre microorganismos Gram negativos e incluyendo en su espectro a bacterias Gram positivas. Este descubrimiento ha llevado a la búsqueda de nuevas quinolonas que incorporan un segundo átomo halogenado o de nitrógeno en posición 8, y que pueden ser muy útiles por tener una mejor absorción oral. El grupo piperacínico heterocíclico en la posición 7, es el responsable de la penetración y de la posibilidad de administración parenteral.

4.2.2. Clasificación

4.2.2.1. Atendiendo a la estructura química

- 1.- Nafiridonas: Acido nalidixico y enoxacino.
- 2.- Cinolonas: Cinoxacino.
- 3.- Pirimidin-Piridonas: Acido pipemídico y ácido piromídico.
- 4.- Quinolonas:
 - 4.1.- Quinolonas no fluoradas: Acido oxolínico, acroxacino, tioxacino, droxacino, miloxacino.
 - 4.2.- Fluorquinolonas:
 - 4.2.1.- Monofluorquinolonas: flumequina, norfloxacino, ofloxacino, ciprofloxacino, pefloxacino, amifloxacino, irloxacino, pifloxacino.
 - 4.2.2.- Difluorquinolonas: lomefloxacino, difloxacino, sparfloxacino.
 - 4.2.3.- Trifluorquinolonas: temafloxacino, flerofloxacino, tosufloxacino.

4.2.2.2. Atendiendo a la aparición en clínica y comercialización (114)

- 1.- Primera generación: ácido nalidixico, ácido oxolínico, ácido pipemídico, ácido piromídico, flumequina, etc.
- 2.- Segunda generación: ciprofloxacino, norfloxacino, fluoxacino, enoxacino, pefloxacino, ofloxacino, amifloxacino.
- 3.- Tercera generación: di- y tri-fluorquinolonas.

Actualmente, en España está comercializadas cuatro fluorquinolonas: norfloxacino, ciprofloxacino, enoxacino y ofloxacino.

4.2.3. Mecanismo de acción

Desde su origen se ha considerado que las 4-quinolonas actúan sobre la girasa del ADN bacteriano (115, 116). No obstante, en los últimos años ha habido algunas aportaciones que sugieren la existencia de mecanismos adicionales que también podrían ser responsables de la acción antibacteriana de este grupo de fármacos.

El punto de acción de las quinolonas es la DNA-girasa o topoisomerasa II, que cataliza el superenrollamiento negativo del DNA bacteriano (117, 118, 119, 120). La topoisomerasa II está compuesta de cuatro subunidades (121): dos monómeros α (Subunidad A) y dos monómeros β (Subunidad B) codificados respectivamente por los genes *gyr A* y *gyr B* del cromosoma en *E. coli*. La subunidad A de la topoisomerasa II actúa realizando incisiones a intervalos en sitios específicos del DNA, y posteriormente los une corrigiendo estos cortes, todo lo cual permite la formación de una superespiral, compacta y apretada. La subunidad B es la responsable de la hidrólisis del ATP que se requiere en la acción. Las quinolonas bloquean la acción de la subunidad A, y también es probable que la de la subunidad B. Este hecho provoca que el DNA no pueda situarse adecuadamente en el interior de la bacteria, por problema de espacio, y que la bacteria se elongue y posteriormente se destruya (118).

Por otra parte, se ha comprobado la producción de exonucleasas por parte de las bacterias, las cuales se piensa que producirían una rápida desintegración del DNA en todos los sitios donde hubiese quedado un corte sin unir, lo que daría lugar a múltiples roturas en el cromosoma, con la consiguiente muerte celular (122). Esto requeriría de síntesis de RNA seguida de síntesis proteica antes de que pudiera apreciarse la actividad de las quinolonas, lo que hace que la actividad bactericida de estas moléculas sea dependiente de la síntesis de RNA y proteínas. Para explicar la producción de exonucleasas se hace referencia a la existencia de una fuerte inducción del gen *recA* del mecanismo SOS de reparación de DNA (observado en *E. coli*) (123). La respuesta SOS es una respuesta de las bacterias a determinados agentes agresivos y se caracteriza por la síntesis no replicativa (reparación del DNA) e inhibición de la división celular, lo que da lugar a filamentación. La respuesta SOS, por tanto, es un mecanismo defensivo de la bacteria para evitar una lesión mayor del DNA, pero si la concentración del antimicrobiano es grande o actúa durante mucho tiempo, el fenómeno de inducción de la síntesis no replicativa se mantiene mucho tiempo y se produce la muerte celular.

Este parece ser el **mecanismo A**, común a todas las quinolonas y bloqueado por rifampicina y cloranfenicol, y que como hemos visto, sería dependiente de la división celular y de

la síntesis de RNA y proteínas. Sin embargo, se ha propuesto un segundo **mecanismo B** en el caso de ofloxacino y ciprofloxacino (118, 124), que no es inhibido por rifampicina y cloranfenicol, no necesita de las proteínas bacterianas ni de la síntesis de RNA y es independiente de la división celular.

Por último, algunos estudios han propuesto que las quinolonas no se unen a la subunidad A de la girasa sino que forman un complejo con esta subunidad y el DNA, lo que implicaría una interacción directa con el material genético (125, 126). Cuatro moléculas del antimicrobiano se unirían al ADN e interaccionarían entre si hidrofólicamente, proponiéndose una unión a la girasa mediante el carbono 7 de la quinolona.

4.2.4. Penetración y acumulación intracelular

La **penetración** en las bacterias gramnegativas está mejor estudiada que para las grampositivas, proponiéndose que el paso de la membrana externa sería por difusión pasiva a través de poros ompF o bien vía fosfolípidos (127, 128).

Hay pocos trabajos que describen como las quinolonas atraviesan la membrana interna de la bacteria: unos (128, 129) consideran que se realiza por difusión pasiva y otros (130, 131) que debe existir un mecanismo de transporte activo.

La **acumulación** de las quinolonas en el interior de la bacteria es rápida y supone una entrada máxima durante los primeros 10 segundos; la segunda etapa es más lenta y se prolonga durante 30 minutos (132, 133).

4.2.5. Factores que influyen en la actividad de las quinolonas

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

- **Inóculo:** Afecta de forma ligera a la actividad de las quinolonas fluoradas y de manera más acusada a las no fluoradas.

- **Medio de cultivo:** El comportamiento de las quinolonas es similar sea cual fuere el medio utilizado aunque se han encontrado algunas diferencias cuando comparamos medios con agar y medios líquidos (134).

- **pH:** De forma general puede afirmarse que la actividad de las fluorquinolonas disminuye progresivamente a medida que desciende el pH. Por el contrario, las quinolonas antiguas suelen ser más activas a pH bajo (124, 135).

- **Iones:** Hay unanimidad en considerar que la eficacia antibacteriana disminuye en presencia de iones metálicos (134, 135) y se modifica más la actividad bactericida que la bacteriostática.

- **Suero:** Las fluorquinolonas tienen baja afinidad por las proteínas séricas, por lo que su actividad apenas se ve modificada (134).

4.2.6. Espectro de acción

El espectro de acción de las quinolonas es amplio y varía desde algunas especies de bacterias gramnegativas de las primeras quinolonas, hasta el aumento gradual a otras bacterias en las nuevas sustancias; primero contra enterobacterias y otros aerobios gramnegativos, más tarde frente a ciertos aerobios grampositivos y bacterias intracelulares, y más recientemente contra los anaerobios y ciertos protozoos (136, 137, 138).

4.2.7. Mecanismos de resistencia

Las resistencias a las quinolonas que se han encontrado son fundamentalmente cromosómicas, y pueden ser de dos clases:

- Por mutaciones que afectan a la DNA girasa, y que principalmente se producen en el gen *gyr A* que codifica para la subunidad A de la girasa (139).

- Por mutaciones que disminuyen la permeabilidad bacteriana por modificación de los poros, probablemente por alteración de los lipopolisacáridos de la pared (140), que impiden la entrada de estos compuestos dentro de la bacteria.

4.2.8. Farmacocinética

Las quinolonas presentan características farmacocinéticas muy similares entre sí. El tiempo de absorción tras administración por vía oral oscila entre 1 y 3 horas (141). Las constantes de absorción y eliminación son independientes de la dosis administrada por lo que el incremento de la C_{max} y el área bajo la curva (ABC) es proporcional al incremento de la dosis.

La penetración tisular de los agentes antibacterianos es importante para su actividad en el lugar de la infección. Puesto que la unión a proteínas séricas de las quinolonas es baja y su peso molecular es pequeño, las condiciones son favorables a la penetración tisular. En general (142, 143, 144, 145), todas las quinolonas se unen a proteínas plasmáticas en un bajo porcentaje, 15-40%, independientemente de las concentraciones totales plasmáticas, siendo la difusión y penetración tisulares amplias (146), alcanzando altas concentraciones en los tejidos periféricos y fluidos orgánicos (líquido prostático, bilis, saliva, líquido cefalorraquídeo, secreción bronquial) y oscilando su volumen de distribución entre 1 y 3 l/kg. Difunden bien en los exudados inflamatorios (113) así como en el líquido amniótico y leche materna (147), con una elevada penetración tanto en macrófagos como en polimorfonucleares.

La principal vía de eliminación es el riñón, tanto por filtración glomerular como por secreción tubular activa, y en menor proporción por tracto gastrointestinal, aunque hay variaciones según la quinolona.

4.2.9. Efectos secundarios y toxicidad

Generalmente son pocos, considerándose a las fluorquinolonas como antibióticos relativamente seguros (148). Las reacciones adversas más frecuentes afectan al aparato digestivo con náuseas, vómitos y diarreas. Con relación al sistema nervioso central se han descrito temblores, vértigos, agitación, insomnios, somnolencias y cefaleas. En la piel, se ha observado prurito, exantema cutáneo y en algunos casos, reacciones de fotosensibilidad.

4.2.10. Indicaciones

Suelen administrarse para tratar infecciones urinarias agudas y complicadas, infecciones entéricas, respiratorias, osteoarticulares, de la piel y tejidos blandos, infecciones de transmisión sexual e infecciones sistémicas graves (141, 149).

Respecto a las infecciones respiratorias, suelen administrarse para el tratamiento de infecciones respiratorias de origen comunitario causadas por gramnegativos, neumonías intra- y extrahospitalarias, sobreinfecciones por *Haemophilus* o bacilos gramnegativos en bronquitis crónica, bronquiectasias, o fibrosis quística infectada por *Pseudomonas*. En los últimos años, se ha tratado de ampliar el uso de las quinolonas a las infecciones respiratorias producidas por grampositivos (150, 151).

4.3. CIPROFLOXACINO

4.3.1. Estructura química

Ciprofloxacino es el nombre con el que se conoce al ácido-1-ciclopropil-6-fluor-1,4-dihidro-4-oxo-7(1-piperazinil)3-quinolein carboxílico (Figura 2), y se trata de una fluorquinolona con estructura de 4-quinolona de origen sintética.

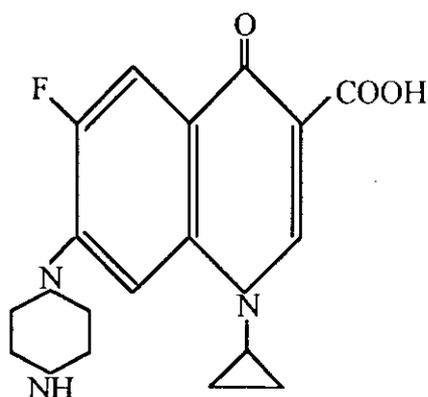


Figura 5

4.3.2. Actividad antibacteriana

Ciprofloxacino posee un amplio espectro de actividad (136, 152, 153, 154) que abarca a casi todos los gérmenes gramnegativos, incluido *Pseudomonas aeruginosa*, y muy especialmente frente al grupo de las enterobacterias. Su acción abarca también gérmenes grampositivos como por ejemplo estafilococos y estreptococos, incluidos los enterococos, algunos anaerobios, *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Rickettsia* y *Micobacterium*.

Actúa tanto en fase de crecimiento exponencial como en fase estacionaria, disminuyendo su potencia bactericida a pH ácido y no influyendo las condiciones de aerobiosis o anaerobiosis (154).

4.3.3. Farmacocinética

La absorción de ciprofloxacino tras su administración por vía oral es buena (75-80%) y se produce con rapidez alcanzando la C_{max} entre 1 y 1,30 horas horas después de su administración (155, 156). Por vía intravenosa la concentración sérica disminuye rápidamente (aproximadamente a la cuarta parte de la dosis) en los primeros 30 minutos (152). Su distribución tisular es muy amplia (109). La penetración intracelular es buena y el volumen de distribución en estado estacionario oscila entre 2 y 3 l/kg, por tanto, las concentraciones en los diferentes tejidos orgánicos son elevadas. La unión a proteínas es baja, 20-28%. Se excreta por orina en un 80-85%, lo cual explica porque se alcanzan concentraciones muy elevadas en orina.

II. OBJETIVOS

1°.- Estudio de la actividad antimicrobiana de amoxicilina/clavulánico y ciprofloxacino frente a tres cepas de *S. pneumoniae* de diferente serotipo y sensibilidad a penicilina, medida en CMI y CMB y mediante curvas de letalidad.

2°.- Estudio del efecto postantibiótico de estos antimicrobianos frente a las tres cepas que se ensayan después de su exposición a diferentes concentraciones de los mismos.

3°.- Diseño de un modelo experimental de neumonía neumocócica en ratón, estableciendo las mínimas dosis letales a utilizar con cada cepa así como las lesiones histopatológicas pulmonares producidas con cada una de las cepas ensayadas.

4°.- Valoración de la eficacia de amoxicilina/clavulánico y ciprofloxacino en el modelo experimental de neumonía neumocócica en ratón, estudiando para ello diferentes parámetros como porcentajes de supervivencia, curvas de letalidad "in vivo", negativización de hemocultivos, y parámetros farmacocinéticos.

III. MATERIAL Y METODOS

1. MATERIAL

1.1. MICROORGANISMOS

Las cepas utilizadas para la realización de este trabajo fueron 3 aislados clínicos de *Streptococcus pneumoniae* de diferente serotipo y diferente sensibilidad a penicilina:

- *Streptococcus pneumoniae* M-17912, serotipo 3 y sensible a penicilina.
- *Streptococcus pneumoniae* FJD-86, serotipo 6 y de resistencia intermedia a penicilina.
- *Streptococcus pneumoniae* FJD-75, serotipo 9 y resistente a penicilina.

La cepa del serotipo 3 fue proporcionada por el Itto. de Salud Carlos III de Majadahonda, y las de los serotipos 6 y 9 proceden de la Fundación Jimenez Díaz de Madrid, y se conservaron en placas de agar Columbia suplementado con un 5% de sangre de cordero (Biomérieux, S.A.) a 0 °C, llevándose a cabo resiembras en medio fresco cada 3-4 días, incubándose a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂ durante 16-18 horas.

1.2. ANTIMICROBIANOS

Los antimicrobianos utilizados en los ensayos fueron: amoxicilina/clavulánico y ciprofloxacino, suministrados por Beecham S.A. y Bayer S.A., respectivamente.

El suministro de los fármacos se realizó en forma de polvo valorado cuyas potencias respectivas fueron de 84,5% para amoxicilina, 95.3% para clavulánico y 85.6% para ciprofloxacino. Los stocks fueron preparados de acuerdo con las instrucciones del laboratorio farmacéutico, y se separaron en alícuotas de 500 µl cada una, conservándolas a -18 °C hasta su utilización. Para cada ensayo se utilizó una alícuota que se diluyó en el diluyente adecuado hasta conseguir la concentración requerida.

En el caso de ciprofloxacino, para los ensayos *in vivo* fue utilizada una solución para infusión de ciprofloxacino al 0.2% de uso hospitalario (Baycip Bayer, S.A.).

1.3. ANIMALES

Se utilizaron ratones hembra BALB/c pertenecientes al animalario del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, de entre 8-12 semanas de edad, y de peso 20-22g. Los animales se mantuvieron con aporte de comida y agua "ad libitum" y a temperatura constante, vigilando que no presentaran patología alguna.

2. METODO

2.1. ESTUDIOS *IN VITRO*

2.1.1. Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias y Bactericidas (CMI y CMBs)

Las CMI fueron calculadas en caldo Todd Hewitt (Difco, S.A.), por el método de Macrodilución en tubo (157). Para ello se prepararon una serie de tubos que contenía 1 ml de caldo y concentraciones de antimicrobiano al duplo, es decir, cada tubo tenía doble concentración que el siguiente. El tubo con mayor concentración era de 4 µg/ml y el de menor, de 0.0075 µg/ml. El tubo control contenía 1 ml de caldo sin antimicrobiano. A continuación, se añadió a cada tubo 1 ml de inóculo. Este se preparó ajustando la turbidez de un tubo con solución salina y microorganismos en fase exponencial de crecimiento al tubo nº 1 de la escala de Mc. Farland (3×10^8 UFC/ml) y diluyendo después hasta conseguir una concentración de 10^5 UFC/ml en caldo Todd Hewitt.

La CMI se calculó, transcurridas 18-24 horas en estufa a 37 °C y en una atmósfera del 5% de CO₂, como la mínima concentración de antimicrobiano capaz de impedir el crecimiento visible (turbidez) de la bacteria en comparación con el tubo control.

Para el cálculo de la CMB, se sembraron con un asa de platino en placas con agar Columbia suplementadas con un 5% de sangre de cordero, unos 10µl del contenido de cada tubo con concentración de antibiótico superior a la CMI, y se incubaron 18-24 horas en estufa a 37 °C y en una atmósfera del 5% de CO₂. Se tomó como valor de la CMB la concentración del tubo que había destruido el 99.9% de los microorganismos.

Este proceso se hizo, por duplicado, para amoxicilina, clavulánico, amoxicilina/clavulánico y ciprofloxacino, con las tres cepas de *S. pneumoniae*.

2.1.2. Curvas de letalidad

Las curvas de crecimiento-letalidad se realizaron durante un período de 8 horas, con concentraciones superiores a la CMI de los dos antimicrobianos y con un cultivo de microorganismos control.

Un cultivo ‘overnight’ de cada microorganismo en fase estacionaria de crecimiento fue diluido hasta conseguir una concentración de 10^6 - 10^7 UFC/ml (absorbancia de 0.1 a 580 nm); este cultivo fue repartido en 4 alícuotas, permaneciendo una de ellas como control, mientras que a las otras se les añadieron concentraciones de 1, 4 y 10 veces la CMI de amoxicilina/clavulánico (4:1) y ciprofloxacino, manteniéndose a 37 °C en baño de agitación durante 8 horas. Las curvas se elaboraron a partir de recuentos bacterianos cada dos horas hasta la 8ª.

La concentración de microorganismos se calculó mediante la técnica de recuento en placa (157); este método consiste en hacer una dilución seriada decimal en solución salina (0,9%) del cultivo inicial, obteniendo una serie de tubos que contienen cada uno 10 veces menos concentración de bacterias que el anterior. A continuación se sembraron por duplicado 25 µl de cada tubo en placas de agar Columbia suplementadas con un 5% de sangre de cordero, contándose a las 18-24 horas de incubación el número de UFC/ml y calculándose entonces la concentración del cultivo inicial.

Se midió el efecto antibacteriano de cada antimicrobiano calculando los cambios en la viabilidad bacteriana, es decir calculando la diferencia entre el \log_{10} UFC/ml de las bacterias tratadas a lo largo del tiempo respecto del \log_{10} UFC/ml de las bacterias al inicio del experimento (T=0).

2.1.3. Efecto bactericida

Se utilizaron las curvas de letalidad para su realización. Se consideró que existía efecto bactericida (ó máxima muerte bacteriana), cuando el descenso en las UFC/ml debido al tratamiento antimicrobiano fue mayor a 3 \log_{10} (158).

2.1.4. Efecto postantibiótico (EPA)

La cuantificación del EPA se realizó en un cultivo de microorganismos que se expusieron a la acción del antimicrobiano durante 2 horas, y comparando después el crecimiento con un cultivo control (159).

Los cultivos contenían 30 ml de caldo Todd-Hewitt al que se le añadieron microorganismos en fase estacionaria de crecimiento (procedentes de un cultivo “overnight”), hasta alcanzar una concentración de 10^6 - 10^7 UFC/ml (absorbancia de 0.1 a 580 nm). A continuación, los microorganismos fueron expuestos a 1, 4 y 10 veces la CMI de amoxicilina/clavulánico (4:1) y ciprofloxacino. Para cada concentración y microorganismo se mantuvo un matraz como control, añadiendo el mismo volumen de solución salina; todos los matraces se incubaron a 37 °C en baño con agitación durante 2 horas, momento en que se procedió a eliminar el antibiótico mediante las técnicas de centrifugación y posterior dilución (160). Para ello se centrifugó cada matraz a 3500 rpm durante 10 minutos, eliminándose el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en caldo Todd-Hewitt fresco. Esta operación se realizó dos veces, tanto en los matraces expuestos a antibiótico como en los controles. A continuación, se procedió a hacer una dilución 1:100 del contenido de cada matraz en otro que contenía caldo fresco. Para la cepa de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 9, la dilución efectuada fue 1:10. Después, los matraces fueron incubados 7 horas, de nuevo a 37 °C en baño con agitación.

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

El cálculo de la duración del EPA se efectuó utilizando la fórmula descrita por Mc. Donnal (161):

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

donde, T es el tiempo (en horas) que tarda el cultivo de microorganismos tratados en incrementar 1 Log_{10} su concentración a partir del tiempo 0 (eliminación del antimicrobiano), y C es el tiempo (en horas) que tarda el cultivo control en incrementar 1 Log_{10} su concentración a partir del tiempo 0.

La duración del EPA se tomó como la media de los tres experimentos \pm el error estándar, y se consideró significativo si era superior a 30 minutos (161).

2.2. ESTUDIOS *IN VIVO*

Para los estudios "in vivo" se utilizó un modelo experimental de neumonía en ratón descrito por Esposito y Pennington (20), y posteriormente utilizado con ligeras modificaciones por Azoulay-Dupuis y cols. (22, 162).

De las tres cepas de *Streptococcus pneumoniae* utilizadas para provocar la neumonía, la del serotipo 3 resultó virulenta para los ratones, utilizándose en ese caso ratones inmunocompetentes. Las cepas del serotipo 6 y del serotipo 9, resultaron no virulentas para los ratones (163), por lo que hubo que utilizar ratones inmunocomprometidos o neutropénicos en esos casos.

2.2.1. Neutropenia

Los ratones se inmunodeprimieron con dosis de 150 mg/kg de ciclofosfamida (Genoxal. Laboratorios Funk, S.A.) por vía intraperitoneal en los días 4 y 1 previos al día del experimento (día 0) (164, 165).

Previamente a la aplicación de este modelo se había comprobado la eficacia de la ciclofosfamida como inmunodepresor en el ratón, alcanzando un porcentaje de reducción de leucocitos del 70-84% en el día del experimento (día 0), lo que permite prácticamente anular el sistema inmunológico y evitar una posible interferencia en la infección bacteriana.

2.2.2. Modelo experimental de neumonía

2.2.2.1. Preparación del inóculo

El día anterior al del experimento (día 0) se preparó un inóculo de la bacteria en caldo Todd-Hewitt. Se incubó en estufa a 37 °C y 5% de CO₂ durante toda la noche. El día del experimento se pasó una alícuota de ese cultivo a caldo fresco y se dejó crecer en un

baño con agitación a 37 °C hasta alcanzar turbidez. Ese cultivo, cuyas bacterias se encontraban en fase exponencial de crecimiento, fue centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue eliminado y el sedimento fue resuspendido en solución salina (0.9%), volviéndose a repetir el proceso de centrifugación. El sedimento obtenido de esta segunda centrifugación, fue resuspendido en solución salina y se ajustó su concentración midiendo absorbancia en un espectrofotómetro a 580 nm de luz visible.

2.2.2.2. Infección pulmonar

Los animales fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de 0.18-0.2 ml de pentobarbital sódico (0.65%). Una vez anestesiados, fueron suspendidos verticalmente colgándolos de sus incisivos superiores, y fueron canulados orotraquealmente mediante un catéter flexible (Abbocath G-22), al que se le acopló una jeringilla de 1 ml. A continuación, se inocularon 60 µl de la suspensión en solución salina de microorganismos en fase exponencial de crecimiento.

Los animales permanecieron 5 minutos aproximadamente en posición vertical, tras lo cual fueron pasados a sus jaulas y fueron colocados en un ángulo de 45° para evitar la expulsión del inóculo de los pulmones. En el transcurso de 1-2 horas se recuperaron de la anestesia.

El momento de la inoculación de los animales fue tomado como tiempo 0 del experimento.

2.2.3. Determinación de la Mínima Dosis Letal (MDL) para cada cepa

Se calculó este parámetro para cada cepa de *Streptococcus pneumoniae* utilizada en este estudio. Para ello, se hicieron lotes de 14-16 ratones, y a cada lote se le inoculó una concentración de microorganismos, que fue de 10^3 - 10^6 UFC/ml para la cepa del serotipo 3, y de 10^5 - 10^7 UFC/ml para las cepas de los serotipos 6 y 9. A continuación, se observaron durante 15 días los animales, apuntándose diariamente la mortalidad en cada lote.

Se definió la MDL como la menor concentración de microorganismos a la cual todos los animales mueren (166). La concentración de microorganismos que correspondía

con la MDL para cada cepa, fue la utilizada para todos los experimentos realizados posteriormente.

Por otra parte, y para determinar que el proceso neumónico era causado única y exclusivamente por cada una de las cepas en estudio, y no por cualquier otro factor, al realizar este experimento fue infectado un grupo control de animales (tanto inmunocompetentes como inmunodeprimidos), cada uno de los cuales fue inoculado con 60 μ l de solución salina estéril.

2.2.4. Lesiones histopatológicas en pulmón

Con objeto de estudiar las lesiones que se producían en el tejido pulmonar (17, 167) como consecuencia de la infección neumocócica, un grupo de 10-15 animales fue infectado con la MDL de cada una de las cepas de *S. pneumoniae*.

A las 5, 19, 31 (19+12), 43 (19+24), 67 (19+48) y 91 (19+72) horas p.i. se sacrificaron 2 animales de cada grupo. También se sacrificaron a esos mismos tiempos 2 animales controles (inoculados con solución salina estéril). A cada ratón se le extrajo su pulmón izquierdo (de un sólo lóbulo), el cual fue fijado en formol al 10% por un mínimo de 48 horas. A continuación cada pulmón fue incluido en parafina, y se le realizaron cortes longitudinales de 7 μ m de espesor con un microtomo (Jung Biocut. Leica). Los cortes fueron teñidos con hematoxilina y eosina, y estudiados al microscopio.

2.2.5. Tratamiento antimicrobiano

Tras inocular a los animales y una vez estos se recuperaban de la anestesia, se separaron en lotes de 14-16 ratones. El número de lotes a utilizar para cada cepa variaba en función de las dosis de antimicrobiano a ensayar, como se verá más adelante. Un lote permaneció como control, mientras que al resto se les aplicó un tratamiento antimicrobiano. El momento del inicio del tratamiento variaba, según el tipo de estudio a realizar. Tanto amoxicilina/clavulánico (4:1), como ciprofloxacino, fueron administrados por vía subcutánea en la parte interna del muslo del animal. Para amoxicilina/clavulánico (4:1) el volumen a inyectar fue de 0.1 ml cuando las concentraciones fueron de (5:1.25 - 25:6.25)

mg/kg, y de 0.15 ml cuando la concentración fue de (50:12.5) mg/kg. Para ciprofloxacino el volumen a inyectar fue de 0.5 ml.

Al grupo de animales control, se le inyectó un volumen igual de solución salina que el del antimicrobiano que se estuviera administrando.

2.2.6. Curvas de supervivencia

Para amoxicilina/clavulánico (4:1) el estudio se realizó de la siguiente manera:

- Para la cepa de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 3 se utilizaron 3 lotes de 14-16 animales cada uno. Un grupo permaneció como control y dos grupos fueron tratados con dosis de (5:1.25) mg/kg y (10:2.5) mg/kg respectivamente, empezando el tratamiento a las 19 horas p.i.. Asimismo, para estudiar la influencia del momento del inicio del tratamiento en la supervivencia, tres lotes de animales fueron tratados con su DE₉₀ ((5:1.25) mg/kg) empezando el tratamiento a las 5, 19 y 31 horas p.i. respectivamente.

- Para la cepa de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 6 se utilizaron 4 lotes de 14-16 animales cada uno. Un grupo permaneció como control y 3 grupos fueron tratados con dosis de (5:1.25) mg/kg, (10:2.5) mg/kg, y (25:6.25) mg/kg respectivamente, empezando el tratamiento a las 19 horas p.i.. Asimismo, para estudiar la influencia del momento del inicio del tratamiento en la supervivencia, tres lotes de animales fueron tratados con su DE₉₀ ((25:6.25) mg/kg) empezando el tratamiento a las 5, 19 y 31 horas p.i. respectivamente.

- Para la cepa de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 9 se utilizaron 5 lotes de 14-16 animales cada uno. Un grupo permaneció como control y 4 grupos fueron tratados con dosis de (5:1.25) mg/kg, (10:2.5) mg/kg, (25:6.25) mg/kg y (50:12.5) mg/kg respectivamente, empezando el tratamiento a las 19 horas p.i.. Asimismo, para estudiar la influencia del momento del inicio del tratamiento en la supervivencia, tres lotes de animales fueron tratados con su DE₉₀ ((50:12.5) mg/kg) empezando el tratamiento a las 5, 19 y 31 horas p.i. respectivamente.

En el caso de ciprofloxacino se hicieron 4 lotes de 14-16 animales para cada cepa, dejando en cada caso un grupo como control, y tratando 3 grupos con dosis de 50 mg/kg empezando el tratamiento a las 5, 19 y 31 horas p.i. respectivamente.

Tanto en el caso de amoxicilina/clavulánico (4:1) como de ciprofloxacino, e independientemente de cuando se iniciara el tratamiento, este consistió en 6 dosis espaciadas por intervalos de 12 horas.

Para la elaboración de las curvas de supervivencia para cada cepa y para cada dosis de antimicrobiano, se anotaron diariamente durante un período de 15 días el número de animales de cada lote que sobrevivían al proceso de neumonía. Con esos datos se elaboraron los porcentajes de supervivencia para cada dosis de antimicrobiano, momento de inicio del tratamiento, cepa y día, y se elaboraron las curvas de supervivencia enfrentando esos porcentajes con el tiempo (en días).

2.2.7. Cálculo de las DE_{50} y DE_{90}

Con los datos de supervivencia final obtenidos para cada dosis de amoxicilina/clavulánico empleadas y para cada cepa, cuando el tratamiento comenzaba a las 19 horas p.i., se calcularon las dosis eficaces 50 y 90 (DE_{50} y DE_{90}), definidas como las dosis de antimicrobiano (en mg/kg) necesarias para alcanzar un 50% y un 90% de supervivencia, respectivamente. Para ello se utilizó el método de Reed & Muench (168). Posteriormente, fueron las DE_{90} de amoxicilina/clavulánico para cada cepa las que se utilizaron para estudiar la influencia del momento del inicio del tratamiento en la supervivencia, la elaboración de las curvas de letalidad *in vivo*, los estudios de presencia de microorganismos en sangre y los estudios farmacocinéticos.

En el caso de ciprofloxacino no se calcularon estos parámetros ya que sólo se ensayó la eficacia de una concentración de antimicrobiano.

2.2.8. Recuento del número de UFC en los pulmones. Curvas de letalidad

in vivo.

Para cada cepa y antimicrobiano se determinó la concentración de bacterias que había en el pulmón en distintos momentos del proceso neumónico. Para ello, se hicieron lotes de 15-17 animales, los cuales fueron infectados con cada una de las cepas en estudio. Se dejó un grupo control para cada una de las cepas utilizadas, y los otros lotes recibieron el

tratamiento correspondiente, que se trataba de la DE₉₀ en el caso de amoxicilina/clavulánico:

- Para la cepa de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 3 se administraron a los animales dosis de (5:1.25) mg/kg de amoxicilina/clavulánico y 50 mg/kg de ciprofloxacino.

- Para la cepa de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 6 se administraron a los animales dosis de (25:6.25) mg/kg de amoxicilina/clavulánico y 50 mg/kg de ciprofloxacino.

- Para la cepa de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 9 se administraron a los animales dosis de (50:12.5) mg/kg de amoxicilina clavulánico y 50 mg/kg de ciprofloxacino.

En todos los casos el tratamiento empezó a las 19 horas p.i. y consistió en 6 dosis administradas por vía subcutánea y espaciadas por intervalos de 12 horas. A los grupos control se les administró el mismo volumen de solución salina que de antimicrobiano a los grupos tratados.

Se sacrificaron (por dislocación cervical) 3 animales infectados al inicio del tratamiento (19 horas p.i.), y se sacrificaron 3 animales tanto del grupo control como del grupo que recibía tratamiento a las 8 horas tras la 1ª inyección (27 horas p.i.), a las 12 horas tras la 2ª inyección (43 horas p.i.), a las 12 horas tras la 4ª inyección (67 horas p.i.), a las 12 horas tras la 6ª inyección (91 horas p.i.), y en algunos casos a las 84 horas tras la 6ª inyección (163 horas p.i.).

Después del sacrificio de cada animal y con ayuda de material quirúrgico (pinzas y bisturí) se extrajeron los pulmones del ratón, los cuales se homogeneizaron en 5 ml de solución salina (0.9%), utilizando para ello un mortero de porcelana estéril al que se añadía arena de mar estéril; a continuación se tomó el sobrenadante del mortero y se procedió a realizar el recuento de microorganismos por el método ya descrito de realizar diluciones decimales en solución salina, de las que fueron sembrados 25 µl en placas de agar Columbia suplementadas con un 5% de sangre. Estas fueron incubadas 18-24 horas en estufa con un 5% de CO₂. Tras realizar el recuento, los resultados fueron expresados en UFC/ml de homogeneizado de pulmón. Con estos datos se elaboraron las curvas de letalidad.

Se midió el efecto antibacteriano de cada antimicrobiano calculando los cambios en la viabilidad bacteriana, es decir calculando la diferencia entre el log₁₀ UFC/ml de homogeneizado de pulmón de los animales tratados a lo largo del tiempo respecto del log₁₀

UFC/ml de homogeneizado de pulmón de los animales al inicio del tratamiento (19 horas p.i.).

2.2.9. Presencia de microorganismos en sangre

Con objeto de determinar si se había producido un paso de microorganismos de los pulmones a la sangre, y si se había producido un proceso bacteriémico, y cómo el antimicrobiano influía en ello, de cada animal sacrificado (ver punto 2.2.8.) se extrajo sangre por punción intracardiaca, la cual fue cultivada 24-48 horas en Caldo Tioglicolato (Difco, S.A.). Transcurrido ese tiempo, de los cultivos en los que se observó crecimiento se pasaron unos 10 µl con un asa de platino a placas de agar Columbia suplementadas con un 5% de sangre para confirmar la presencia de *Streptococcus pneumoniae*.

2.2.10. Determinación de los niveles de antimicrobiano en suero y pulmón

Los niveles de amoxicilina y ciprofloxacino en suero y pulmón se determinaron por bioensayo utilizándose el método de difusión en agar de Grove y Randall (15, 169, 170), ligeramente modificado y adaptado a nuestras necesidades. En el caso de amoxicilina se administró amoxicilina/clavulánico (4:1), ya que el ácido clavulánico no interfiere el ensayo microbiológico de la amoxicilina y la amoxicilina no influye en la valoración del ácido clavulánico (171). Los niveles de ácido clavulánico en suero y pulmón no fueron determinados.

a) Elaboración de la recta estándar

Para la preparación de cada antimicrobiano el diluyente utilizado fue PBS (pH=7.2-7.4), siendo las concentraciones utilizadas: 0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 75, 100, 200, 250, 500 µg/ml para ambos antimicrobianos.

Se utilizaron placas Petri de 15 cm de diámetro a las que se añadió una capa de 12 ml de agar Iso-sensitest (Oxoid); una vez solidificó esta primera capa, se añadieron 6 ml del mismo agar pero en el que había sido sembrado en masa un microorganismo patrón a una concentración de 10^5 - 10^6 UFC/ml. El microorganismo utilizado fue *Micrococcus luteus* ATCC 9341 para amoxicilina y *Escherichia coli* ATCC 25922 para ciprofloxacino. Una vez

solidificado el agar, se procedió a hacer pocillos (4-5 por placa) de 10.7 ± 0.1 mm con un tubo de vidrio, extrayendo el trozo de agar con unas pinzas estériles. Cada pocillo fue rellenado con 60 μ l de una solución de cada antibiótico a distintas concentraciones, realizándose el ensayo por triplicado.

Se incubaron las placas a 37 °C y, transcuridas 24 horas, se midieron los halos de inhibición con un calibre, realizándose con los datos una regresión lineal y una recta de mínimos cuadrados (recta estándar) que relacionaba el logaritmo de la carga y el diámetro del halo en milímetros.

b) Muestras de suero y pulmones de ratones

Los niveles de antimicrobiano se determinaron en ratones sanos (controles) y en ratones inmunocompetentes infectados. Para ello se administraron a cada grupo de ratones cada uno de los antimicrobianos en estudio. Para amoxicilina, se administró amoxicilina/clavulánico (4:1) a las dosis de (5:1.25), (25:6.25) y (50:12.5) mg/kg, que se correspondían con las DE₉₀ de cada una de las cepas ensayadas, y para ciprofloxacino la dosis fue de 50 mg/kg. En ambos casos se trató de una monodosis administrada por vía subcutánea. Para los ratones infectados, el antimicrobiano se administró 19 horas después de infectar a los animales con la cepa de *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 3.

A las 0.5, 1, 2, 3, 5, 8, 12 y 24 horas tras la administración del antimicrobiano se procedió a obtener las muestras de sangre y pulmones. Para cada tiempo se utilizaron 3 animales, de los cuales se extrajo la sangre por punción intracardiaca. Las muestras de suero se obtuvieron por posterior centrifugación de la sangre a 3500 rpm durante 10 minutos. Una vez los animales eran desangrados, se extrajeron los pulmones del mismo modo a lo explicado en el punto 2.2.8., y tras pesarlos se guardaron en tubos que contenían 1 ml de PBS.

Tanto los sueros como los pulmones fueron congelados hasta el día del experimento (bioensayo), momento en el que se homogeneizaron los pulmones y se procedió a hacer un "pool" (n=3) tanto de los sueros como de los homogeneizados de los pulmones para cada punto. A continuación se procedió a rellenar tres pocillos por tiempo de extracción, tanto para los sueros como para los pulmones, en placas Petri preparadas de igual forma a la explicada para la recta estándar. Tras incubación a 37 °C durante 24 horas, se midieron los

halos de inhibición obtenidos y se calculó la concentración de antimicrobiano correspondiente mediante la recta estándar y la ecuación de regresión lineal. Con estos datos se prepararon las gráficas de niveles de concentración de antimicrobiano en suero ($\mu\text{g/ml}$) y pulmón ($\mu\text{g/g}$) versus tiempo (h) por cada antimicrobiano, dosis y grupo de ratones (controles o infectados), y asimismo se calcularon parámetros farmacocinéticos como C_{max} , T_{max} , $T_{1/2}$, $T > \text{CMI}$ y ABC.

2.3. ANALISIS ESTADISTICO

Se realizó el siguiente tratamiento estadístico (172), el cual se llevó a cabo en la hoja de cálculo MS-Excel 5.0:

- **Media aritmética y desviación estándar** de los datos obtenidos en cada experimento.

- **T de student** para comparar la significación de los resultados. Las diferencias se consideraron significativas en los casos en los que la probabilidad de que las diferencias se debieran al azar fuera $p \leq 0.05$.

- **Recta de regresión** mediante el método de mínimos cuadrados para la elaboración de la recta estándar en los ensayos de farmacocinética.

IV. RESULTADOS

1. ESTUDIOS IN VITRO

1.1. CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS Y BACTERICIDAS (CMIs Y CMBs)

Las CMIs y CMBs de los antimicrobianos estudiados frente a *S. pneumoniae* serotipo 3, *S. pneumoniae* serotipo 6 y *S. pneumoniae* serotipo 9, se muestran en la tabla 1.

En el caso de amoxicilina, se observan diferentes sensibilidades en cada una de las cepas. Asimismo, se observa que el ácido clavulánico por sí sólo, no presenta apenas actividad antibacteriana frente a las tres cepas en estudio, y que no afecta a la actividad de amoxicilina, ya que se obtuvieron las mismas CMIs para amoxicilina/clavulánico (4/1), que para amoxicilina.

Para ciprofloxacino, se obtuvieron CMIs de entre 0.5-1 mg/l.

Los valores de las CMBs coinciden con los de las CMIs en el caso de amoxicilina, sin embargo, no coinciden en el caso de ciprofloxacino, que son una dilución mayor que las CMIs.

1.2. CURVAS DE LETALIDAD

Las curvas de crecimiento-letalidad de los antimicrobianos en estudio están representadas en las figuras 1, 2 y 3.

1.2.1. Curvas de letalidad de *S. pneumoniae* serotipo 3

La figura 1, refleja la curva de letalidad de *S. pneumoniae* serotipo 3, tratado con 1, 4 y 10 CMI de amoxicilina/clavulánico (4:1) (fig. 1.a), y ciprofloxacino (fig. 1.b). Los cambios en la viabilidad de *S. pneumoniae* serotipo 3 debido a la acción de estos dos antimicrobianos se observan en la tabla 2.

El análisis estadístico (t Student) de estos datos confirmó que existían diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre los cambios en la viabilidad bacteriana de las bacterias control y las bacterias tratadas con ambos antimicrobianos (tabla 2).

También se estudió (tabla 2), la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) en los cambios en la viabilidad bacteriana entre las bacterias tratadas con 1 y 4 CMI, las tratadas con 1 y 10 CMI, y las tratadas con 4 y 10 CMI en cada tiempo y para cada antimicrobiano, encontrándose que en líneas generales, para ambos antimicrobianos existían diferencias en el tratamiento con 1 y 4 CMI, y 1 y 10 CMI, pero no había diferencias entre 4 y 10 CMI.

Asimismo (tabla 2), se estudió la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) en los cambios en la viabilidad bacteriana tras el tratamiento a cada concentración y tiempo con amoxicilina/clavulánico y ciprofloxacino, encontrándose que principalmente existían diferencias entre el tratamiento con amoxicilina/clavulánico y ciprofloxacino, a favor del primero, a la concentración de 1 CMI. A 4 y 10 CMI, no existían diferencias de forma generalizada, pero cuando existían eran a favor de amoxicilina/clavulánico.

1.2.2. Curvas de letalidad de *S. pneumoniae* serotipo 6

La figura 2, refleja la curva de letalidad de *S. pneumoniae* serotipo 6, tratado con 1, 4 y 10 CMI de amoxicilina/clavulánico (4:1) (fig. 2.a), y ciprofloxacino (fig. 2.b). Los cambios en la viabilidad de *S. pneumoniae* serotipo 6 debido a la acción de estos dos antimicrobianos se observan en la tabla 3.

El análisis estadístico (t Student) de estos datos confirmó que existían diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre los cambios en la viabilidad bacteriana de las bacterias control y las bacterias tratadas con ambos antimicrobianos (tabla 3).

También se estudió (tabla 3), la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) en los cambios en la viabilidad bacteriana entre las bacterias tratadas con 1 y 4 CMI, las tratadas con 1 y 10 CMI, y las tratadas con 4 y 10 CMI en cada tiempo y para cada antimicrobiano, encontrándose que para amoxicilina/clavulánico sólo existen diferencias entre 1 y 4 CMI, y 1 y 10 CMI a partir de la 6ª hora de tratamiento, mientras que para ciprofloxacino esas diferencias ocurren desde la 2ª hora de tratamiento. Para ninguno de los antimicrobianos se observan diferencias entre 4 y 10 CMI.

Asimismo (tabla 3), se estudió la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) en los cambios en la viabilidad bacteriana tras el tratamiento a cada concentración y tiempo con amoxicilina/clavulánico y ciprofloxacino, encontrándose que existían diferencias entre el tratamiento con amoxicilina/ac. clavulánico y ciprofloxacino, y siempre a favor del segundo, en la 8ª hora de tratamiento con 1 CMI, y a partir de la 2ª hora de tratamiento a las concentraciones de 4 y 10 CMI.

1.2.3. Curvas de letalidad de *S. pneumoniae* serotipo 9

La figura 3, refleja la curva de letalidad de *S. pneumoniae* serotipo 9, tratado con 1, 4 y 10 CMI de amoxicilina/clavulánico (4:1) (fig. 3.a), y ciprofloxacino (fig. 3.b). Los cambios en la viabilidad de *S. pneumoniae* serotipo 9 debido a la acción de estos dos antimicrobianos se observan en la tabla 4.

El análisis estadístico (t Student) de estos datos confirmó que existían diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre los cambios en la viabilidad bacteriana de las bacterias control y las bacterias tratadas con ambos antimicrobianos (tabla 4).

También se estudió (tabla 4), la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) en los cambios en la viabilidad bacteriana entre las bacterias tratadas con 1 y 4 CMI, las tratadas con 1 y 10 CMI, y las tratadas con 4 y 10 CMI en cada tiempo y para cada antimicrobiano, encontrándose que para amoxicilina/clavulánico no existen diferencias, salvo entre 1 y 10 CMI en la 2ª y 8ª hora, mientras que para ciprofloxacino existen diferencias entre 1 y 4 CMI, y entre 1 y 10 CMI en todos los tiempos, y sólo en la 8ª hora para 4 y 10 CMI.

Asimismo (tabla 4), se estudió la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) en los cambios en la viabilidad bacteriana tras el tratamiento a cada concentración y tiempo con amoxicilina/clavulánico y ciprofloxacino, encontrándose que existían diferencias entre el tratamiento con amoxicilina/clavulánico y ciprofloxacino, a favor del primero, a la concentración de 1 CMI. A 4 y 10 CMI, no existían diferencias de forma generalizada, pero cuando existían (8ª hora a 10 CMI) eran a favor de ciprofloxacino.

1.3. EFECTO BACTERICIDA

En la figura 4, se representan (como el valor absoluto de la media) los cambios de viabilidad alcanzados con cada antimicrobiano y concentración para cada cepa, señalándose con una recta el punto a partir del cual se alcanza el efecto bactericida.

En la tabla 5, se observa el tiempo exacto en horas en el que se alcanza (si se alcanza) el efecto bactericida. En el caso de *S. pneumoniae* serotipo 3, amoxicilina/clavulánico tiene efecto bactericida tanto a 1, 4 ó 10 CMI, alcanzándose este efecto antes a mayor concentración de antimicrobiano, mientras que ciprofloxacino sólo tiene efecto bactericida a 10 CMI, y tarda 2 horas más en alcanzarlo que amoxicilina/clavulánico (7.47 h frente a 5.27 h).

Para *S. pneumoniae* serotipo 6, amoxicilina/clavulánico no tiene efecto bactericida a ninguna de las concentraciones ensayadas, mientras que ciprofloxacino si alcanza efecto bactericida tanto a 4 CMI (a las 5.19 h) como a 10 CMI (a las 4.86 h).

Para *S. pneumoniae* serotipo 9, tanto con amoxicilina/clavulánico como con ciprofloxacino existe efecto bactericida a 4 y 10 CMI, pero con ciprofloxacino se alcanza antes este efecto.

1.4. EFECTO POSTANTIBIOTICO

El efecto inducido “in vitro” sobre el crecimiento de las tres cepas de *S. pneumoniae* tras una exposición de 2 horas a 1, 4 y 10 CMI de los dos antimicrobianos ensayados se muestran en las figuras 5, 6 y 7.

En la tabla 6, se muestran los valores de EPA para cada cepa y antimicrobiano. Se realizó un análisis estadístico (t Student) con objeto de determinar si existían diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre las distintas concentraciones utilizadas de cada antimicrobiano en la inducción de un mayor EPA, encontrándose (tabla 6) que amoxicilina/clavulánico para las cepas de los serotipos 3 y 9 a la concentración de 10 CMI producía mayores EPAs que 1 CMI, no habiendo diferencias en los EPAs inducidos por 1 y 4 CMI y por 4 y 10 CMI. Para la cepa del serotipo 6 tanto a 4 como a 10 CMI se inducía un mayor EPA que a 1 CMI, no habiendo diferencias entre los EPAs obtenidos con 4 y 10 CMI. Ciprofloxacino sólo produce un mayor EPA a 10 CMI que a 1 CMI para la cepa del

serotipo 3, mientras que para las cepas de los serotipos 6 y 9 tanto a 4 como a 10 CMI se inducía un mayor EPA que a 1 CMI, no habiendo diferencias entre los EPAs obtenidos con 4 y 10 CMI.

Por otra parte, se determinó mediante análisis estadístico (t Student) si existían diferencias en la duración del EPA producido por amoxicilina/clavulánico y ciprofloxacino en cada cepa ensayada (tabla 6), encontrando que no había diferencias entre la utilización de ambos antimicrobianos en el caso de la cepa del serotipo 3, que sólo había diferencias a 10 CMI para la cepa del serotipo 6, de manera que ciprofloxacino inducía un mayor EPA, y que a 1 y 4 CMI amoxicilina/clavulánico inducía un mayor EPA que ciprofloxacino para la cepa del serotipo 9.

2. ESTUDIOS *IN VIVO*

2.1. DETERMINACION DE LA MDL PARA CADA CEPA

En las figuras 8, 9 y 10 quedan reflejados los porcentajes de supervivencia de los animales infectados con diferentes inóculos de *S. pneumoniae* del serotipo 3, 6 y 9, en los 15 días siguientes a la infección. Como se puede ver en ellas, los animales que fueron inoculados con solución salina estéril, tanto si eran inmunocompetentes como inmunodeprimidos, sobrevivían al cabo de este periodo de tiempo, y los animales infectados con cada una de las tres cepas del estudio tenían menor porcentaje de supervivencia cuanto mayor era la concentración de microorganismos utilizada.

En la tabla 7, se muestra el porcentaje de supervivencia final (tras 15 días) obtenido con cada inóculo y para cada cepa. En la tabla 8, se indica la MDL para cada microorganismo, que como se puede ver es más alta para los serotipos 6 y 9 que para el 3, a pesar de estar inmunodeprimidos los ratones en ese caso.

2.2. LESIONES HISTOPATOLOGICAS EN PULMON

El estudio de las lesiones anatomopatológicas del pulmón reveló los siguientes resultados:

2.2.1. Grupo control

Los pulmones de los ratones controles, a los que sólo les había sido inoculada solución salina estéril, fueron estudiados al igual que en los demás grupos a las 5, 19, 31, 43 (19+24), 67 (19+48) y 91 (19+72) horas p.i., no encontrándose alteraciones en ningún caso, tanto si se trataba de ratones inmunocompetentes como inmunodeprimidos. Así, como se puede ver en la figura 11, en todos los casos las luces alveolares estaban vacías, los tabiques alveolares presentaban un aspecto normal, y no existía reacción inflamatoria.

2.2.2. Grupo 1: Ratones infectados por *S. pneumoniae* serotipo 3

En este grupo a las 5 horas p.i. no se aprecian alteraciones histopatológicas. A las 19 horas p.i., aparecen infiltrados (leucocitos) inflamatorios peribronquiales mínimos, y a las 31 horas p.i. se pueden observar abscesos peribronquiales multicéntricos con inflamación aguda, observándose abundante presencia de leucocitos polimorfonucleares, tabiques alveolares rotos, fibras de colágeno sueltas, cuadro que en conjunto constituye una neumonía abscesificante.

A las 43 (19+24) horas p.i., como se puede comprobar en la figura 12, las lesiones histopatológicas son máximas, apreciándose lesiones multicéntricas, masivas, con destrucción alveolar aunque se respeta la pared bronquial, lo cual constituye una neumonía abscesificante confluyente.

2.2.3. Grupo 2: Ratones infectados por *S. pneumoniae* serotipo 6

En este grupo, desde las 5 hasta las 43 (19+24) horas p.i. se puede observar que aunque no existe reacción inflamatoria, aparece una hemorragia intraalveolar parcheada peribronquial, la cual se hace más intensa según pasa el tiempo. Además, a partir de las 31 horas p.i. se puede observar en algunas zonas enfisema y en otras atelectesia.

A las 67 (19+48) horas p.i., se observa ya una clara congestión y dilatación de los capilares alveolares, y se distinguen mallas de fibrina. A las 91 (19+72) horas p.i., como indica la figura 13, las lesiones son máximas, siendo la hemorragia intralveolar masiva,

observándose abscesos confluyentes multicéntricos, con destrucción no sólo alveolar sino también de la pared bronquial, apareciendo la zona central del pulmón necrosada.

2.2.4. Grupo 3: Ratones infectados por *S. pneumoniae* serotipo 9

En este grupo se observan las mismas lesiones histopatológicas que en el grupo 2, es decir, aparece hemorragia intraalveolar desde las 5 horas p.i., la cual se va intensificando hasta alcanzar a las 19+48 horas p.i. su máxima gravedad, momento en que aparece acompañada de edema, enfisema periférico y destrucción alveolar y de la pared bronquial (Figura 13).

2.3. CURVAS DE SUPERVIVENCIA

Las curvas de supervivencia de los animales infectados con cada una de las cepas y tratados con amoxicilina/clavulánico o con ciprofloxacino están representadas en las figuras 14 a 25.

2.3.1. Curvas de supervivencia para *S. pneumoniae* serotipo 3

En la figura 14, se ve la supervivencia de los animales infectados con esta cepa y tratados con (5/1.25) y (10/2.5) mg/kg de amoxicilina/clavulánico comenzando el tratamiento a las 19 horas p.i., siendo esta del 100% en ambos casos.

En la figura 15, se observa la supervivencia utilizando (5/1.25) mg/kg de amoxicilina/clavulánico, pero comenzando el tratamiento a las 5, 19 y 31 horas p.i., obteniéndose el 100%, 100% y el 75% respectivamente.

En la figura 16 se puede observar el efecto del tratamiento con 50 mg/kg de ciprofloxacino iniciado a las 5, 19 y 31 horas p.i., donde se obtuvo un 0% de supervivencia en todos los casos.

Por último, en la figura 17, se representa la supervivencia final alcanzada con cada dosis de antimicrobiano, y para cada tiempo de inicio del tratamiento.

2.3.2. Curvas de supervivencia para *S. pneumoniae* serotipo 6

En la figura 18, se ve la supervivencia de los animales infectados con esta cepa y tratados con (5/1.25), (10/2.5) y (25/6.25) mg/kg de amoxicilina/clavulánico comenzando el tratamiento a las 19 horas p.i., siendo esta del 27.27%, 72.73% y 90.91% respectivamente.

En la figura 19, se observa el efecto en la supervivencia, utilizando (25/1.25) mg/kg de amoxicilina/clavulánico, pero comenzando el tratamiento a las 5, 19 y 31 horas p.i., obteniéndose el 100%, 90.91% y el 54,54% respectivamente.

En la figura 20 se puede observar el efecto del tratamiento con 50 mg/kg de ciprofloxacino iniciado a las 5, 19 y 31 horas p.i., donde se obtuvo un 81.81%, 54.54% y 18.18% de supervivencia en cada caso.

Por último, en la figura 21, se representa la supervivencia final alcanzada con cada dosis de antimicrobiano, y para cada tiempo de inicio del tratamiento.

2.3.3. Curvas de supervivencia para *S. pneumoniae* serotipo 9

En la figura 22, se ve la supervivencia de los animales infectados con esta cepa y tratados con (5/1.25), (10/2.5), (25/6.25) y (50/12.5) mg/kg de amoxicilina/clavulánico comenzando el tratamiento a las 19 horas p.i., obteniéndose el 0%, 21%, 52% y 90.09% respectivamente.

En la figura 23, se observa el efecto en la supervivencia, utilizando (50/1.25) mg/kg de amoxicilina/clavulánico, pero comenzando el tratamiento a las 5, 19 y 31 horas p.i., obteniéndose el 100%, 90.09 y el 54.54% respectivamente.

En la figura 24 se puede observar el efecto del tratamiento con 50 mg/kg de ciprofloxacino, iniciado a las 5, 19 y 31 horas p.i., donde se obtuvo un 27,27%, 0% y 0% de supervivencia en cada caso.

Por último, en la figura 25, se representa la supervivencia final alcanzada con cada dosis de antimicrobiano, y para cada tiempo de inicio del tratamiento.

En la tabla 9.a., se recoge la supervivencia alcanzada al final de los 15 días de observación para cada cepa utilizando la dosis de antimicrobiano con la que mayor supervivencia se alcanzó. Estos mismos datos se representan en la figura 26. Como se puede observar, el tiempo transcurrido desde la inoculación de los animales hasta el inicio del tratamiento influye en el éxito de este, pues es evidente que en todos los casos un retraso en el inicio del tratamiento significó una disminución en el porcentaje de supervivencia. Así, en las tablas 9.b. y 9.c. se muestran las diferencias (en %) en la supervivencia entre iniciar el tratamiento a las 5 y las 19 horas p.i., entre iniciarlo a las 19 y 31 horas p.i. y entre iniciarlo a las 5 y 31 horas p.i., para las tres cepas del estudio.

En el caso de amoxicilina/clavulánico (tabla 9.b.), sólo para la cepa del serotipo 3 se obtuvo el mismo resultado de supervivencia tanto a las 19 como a las 5 horas p.i.. Para las cepas de los serotipos 6 y 9 los porcentajes de supervivencia a las 5 y 19 horas p.i. son muy semejantes, aunque ligeramente inferiores (entre un 9.09% y un 9.91% menor) para las 19 horas p.i.. En cambio, los porcentajes de supervivencia obtenidos para todas las cepas a las 31 horas p.i. con amoxicilina/clavulánico, son entre un 25% y un 36.37% inferiores respecto a los alcanzados a las 19 horas p.i., y hasta un 45.46% inferiores respecto a los alcanzados cuando el tratamiento se inició a las 5 horas p.i..

En el caso de ciprofloxacino (tabla 9.c.), este efecto es todavía mayor, pues ya entre las 5 y 19 horas p.i. se observa un descenso del 27% en la supervivencia para las cepas de los serotipos 6 y 9, alcanzándose en el caso de la cepa del serotipo 6 una diferencia del 63.63% en la supervivencia según se inicie el tratamiento a las 5 o 31 horas p.i..

	AMOXICILINA/CLAVULANICO		
	5 h - 19 h	19 h - 31 h	5 h - 31 h
<i>S. pneumoniae</i> ser 3	0%	25%	25%
<i>S. pneumoniae</i> ser 6	9.09%	35.55%	45.46%
<i>S. pneumoniae</i> ser 9	9.91%	36.37%	45.46%

Tabla 9.b.: Diferencia (en %) en la supervivencia alcanzada según el momento del inicio del tratamiento con amoxicilina/clavulánico.

	CIPROFLOXACINO		
	5 h - 19 h	19 h - 31 h	5 h - 31 h
<i>S. pneumoniae</i> ser 3	-	-	-
<i>S. pneumoniae</i> ser 6	27.27%	36.36%	63.63%
<i>S. pneumoniae</i> ser 9	27.27%	-	27.27%

Tabla 9.c.: Diferencia (en %) en la supervivencia alcanzada según el momento del inicio del tratamiento con ciprofloxacino.

Por otra parte, si se comparan amoxicilina/clavulánico y ciprofloxacino, se puede decir que el primero es más eficaz, ya que como se observa claramente con amoxicilina/clavulánico los porcentajes de supervivencia son mayores en todos los casos. En la tabla 9.d., se han calculado las diferencias (en %) entre la supervivencia obtenida, para cada cepa y tiempo de inicio del tratamiento, para los dos antimicrobianos utilizados. Para la cepa del serotipo 3, el tratamiento con (5/1.25) mg/kg de amoxicilina/clavulánico es un 100% más eficaz que el tratamiento con 50 mg/kg de ciprofloxacino independientemente que el tratamiento se iniciara a las 5, 19 o 31 horas p.i.. En el caso de la cepa del serotipo 6, el tratamiento con (25/6.25) mg/kg de amoxicilina/clavulánico es un 18.19% más eficaz que el tratamiento con 50 mg/kg de ciprofloxacino cuando el tratamiento se inicia a las 5 horas p.i., y el porcentaje aumenta a un 36% cuando el tratamiento se inicia a las 19 o 31 horas p.i.. Por último, para la cepa del serotipo 9 el tratamiento con (50/12.5) mg/kg de amoxicilina/clavulánico es un 72.73%, 90.09% y 54.54 % más efectivo que el tratamiento con 50 mg/kg de ciprofloxacino según el tratamiento se iniciara a las 5, 19 o 31 horas p.i.. La eficacia de amoxicilina/clavulánico respecto a ciprofloxacino es mayor para todas las cepas ensayadas, incluso siendo menores las dosis ensayadas de amoxicilina/clavulánico que de ciprofloxacino para las cepas de los serotipos 3 y 6.

	AMOXICILINA/CLAVUL. - CIPROFLOXACINO		
	5h (A/C) - 5h (C)	19h (A/C) - 19h (C)	31h (A/C) - 31h (C)
<i>S. pneumoniae</i> ser 3	100%	100%	100%
<i>S. pneumoniae</i> ser 6	18.19%	36.37%	36.36%
<i>S. pneumoniae</i> ser 9	72.73%	90.09%	54.54%

Tabla 9.d.: Diferencias (en %) entre la supervivencia obtenida con amoxicilina/clavulánico (A/C) y ciprofloxacino.

2.4. DE₅₀ Y DE₉₀

Las DE₅₀ y DE₉₀ de amoxicilina/clavulánico para las cepas de los serotipos 3, 6 y 9, empezando el tratamiento a las 19 horas p.i., aparecen calculadas en la tabla 10.

	DE ₅₀ (mg/kg)	DE ₉₀ (mg/kg)
<i>S. pneumoniae</i> ser 3	≤ 5/1.25	≤ 5/1.25
<i>S. pneumoniae</i> ser 6	7.08/1.77	23.71/5.93
<i>S. pneumoniae</i> ser 9	23.99/5.99	49.92/12.48

Tabla 10. DE₅₀ y DE₉₀ de amoxicilina/clavulánico para las 3 cepas ensayadas.

La DE₅₀ y DE₉₀ de amoxicilina/clavulánico para la cepa del serotipo 3 no se pudo calcular, al obtenerse con la menor dosis empleada (5 mg/kg) una supervivencia del 100%.

Como ya se mencionó en el capítulo de material y métodos, para estudiar la influencia del momento del inicio del tratamiento en la supervivencia, la elaboración de las curvas de letalidad *in vivo*, los estudios de presencia de microorganismos en sangre y los

estudios farmacocinéticos, se utilizaron las DE_{90} de amoxicilina/clavulánico. Para ello, estas se redondearon a 5, 25 y 50 mg/kg. Además, la DE_{50} para amoxicilina/clavulánico para la cepa del serotipo 6, se aproxima a la dosis ensayada de 10/2.5 mg/kg. Asimismo, la DE_{50} para la cepa del serotipo 9, se aproxima a la dosis ensayada de 25/6.25 mg/kg.

2.5. CURVAS DE LETALIDAD *IN VIVO*

Las curvas de letalidad “in vivo” para *S. pneumoniae* serotipo 3, 6 y 9 tras el tratamiento con amoxicilina/clavulánico o ciprofloxacino están representadas en las figuras 27, 28 y 29.

2.5.1. Curvas de letalidad *in vivo* de *S. pneumoniae* serotipo 3

La figura 27, refleja la curva de letalidad “in vivo” de *S. pneumoniae* serotipo 3, tras recibir los ratones un tratamiento de (5/1.25) mg/kg de amoxicilina/clavulánico (fig. 27.a.), y 50 mg/kg de ciprofloxacino (fig. 27.b.). Claramente se puede observar que amoxicilina/clavulánico consigue erradicar los microorganismos de los pulmones de los animales infectados y que ciprofloxacino no.

Los cambios en la viabilidad de *S. pneumoniae* serotipo 3 debido a la acción de estos dos antimicrobianos se observan en la tabla 11. El análisis estadístico (t de Student) confirmó (tabla 11), que las diferencias entre los cambios en la viabilidad bacteriana del grupo de animales controles y de los tratados eran estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) para amoxicilina/clavulánico, y que no lo eran para ciprofloxacino.

Asimismo, se compararon los cambios en la viabilidad bacteriana producidos por amoxicilina/clavulánico y ciprofloxacino, observándose, como también se refleja en la tabla 11, que esas diferencias favorables a amoxicilina/clavulánico eran estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) en todos los casos.

2.5.2. Curvas de letalidad *in vivo* de *S. pneumoniae* serotipo 6

La figura 28, refleja la curva de letalidad “in vivo” de *S. pneumoniae* serotipo 6, tras recibir los ratones un tratamiento de (25/6.25) mg/kg de amoxicilina/clavulánico (fig. 28.a.),

y 50 mg/kg de ciprofloxacino (fig. 28.b.). Claramente se puede observar que amoxicilina/clavulánico consigue erradicar los microorganismos de los pulmones de los animales infectados y que ciprofloxacino no.

Los cambios en la viabilidad de *S. pneumoniae* serotipo 6 debido a la acción de estos dos antimicrobianos se observan en la tabla 12. El análisis estadístico (t de Student) confirmó (tabla 12), que las diferencias entre los cambios en la viabilidad bacteriana del grupo de animales controles y de los tratados eran estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) para amoxicilina/clavulánico desde el inicio del tratamiento, y que no lo eran para ciprofloxacino hasta finalizar este.

Asimismo, se compararon los cambios en la viabilidad bacteriana producidos por amoxicilina/clavulánico y ciprofloxacino, observándose, como también se refleja en la tabla 12, que esas diferencias no eran estadísticamente significativas en todos los casos, pero cuando lo eran era a favor de amoxicilina/clavulánico.

2.5.3. Curvas de letalidad *in vivo* de *S. pneumoniae* serotipo 9

La figura 29, refleja la curva de letalidad “in vivo” de *S. pneumoniae* serotipo 9, tras recibir los ratones un tratamiento de (50/12.5) mg/kg de amoxicilina/clavulánico (fig. 29.a.), y 50 mg/kg de ciprofloxacino (fig. 29.b.). Claramente se puede observar que amoxicilina/clavulánico consigue erradicar los microorganismos de los pulmones de los animales infectados y que ciprofloxacino no.

Los cambios en la viabilidad de *S. pneumoniae* serotipo 9 debido a la acción de estos dos antimicrobianos se observan en la tabla 13. El análisis estadístico (t de Student) reveló (tabla 13), que las diferencias entre los cambios en la viabilidad bacteriana del grupo de animales controles y de los tratados no eran estadísticamente significativas ($p \geq 0.05$) ni para amoxicilina/clavulánico ni para ciprofloxacino a las 8 horas de la 1ª dosis y a las 12 h de la 2ª dosis.

Asimismo, se compararon los cambios en la viabilidad bacteriana producidos por amoxicilina/clavulánico y ciprofloxacino, observándose, como también se refleja en la tabla 13, que esas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) hasta después de la 6ª dosis, y que cuando lo eran era a favor de amoxicilina/clavulánico.

En la figura 30 se representan los cambios de viabilidad obtenidos para cada antimicrobiano y con cada cepa, a las 91 horas p.i. o lo que es lo mismo, 12 horas después de la 6ª y última dosis. Se observa claramente, como para las tres cepas amoxicilina/clavulánico produce un mayor descenso en la viabilidad bacteriana que ciprofloxacino.

2.6. PRESENCIA DE MICROORGANISMOS EN SANGRE

Las tablas 14, 15 y 16, recogen los resultados sobre el paso de cada una de las cepas de este estudio de los pulmones a la sangre.

2.6.1. Presencia de *S. pneumoniae* serotipo 3 en sangre

En la tabla 14, se refleja el número de animales que presentaron un hemocultivo positivo para este microorganismo respecto del total de animales sacrificados a cada tiempo, para aquellos animales que no recibieron tratamiento (controles) y tras el tratamiento con amoxicilina/clavulánico y ciprofloxacino.

Como se puede observar, en los ratones que no recibieron tratamiento el paso de *S. pneumoniae* serotipo 3 a la sangre ya se había producido a las 19 horas p.i. en el 100% (3/3) de los animales, y el microorganismo permaneció en sangre en el 100% de los ratones hasta que se produjo su muerte. Esto indica que junto al proceso neumónico el animal sufre un proceso bacteriémico, siendo probable que la muerte del animal se produzca por la suma de ambos.

El tratamiento bien con amoxicilina/clavulánico o con ciprofloxacino se inicia cuando el microorganismo ya ha pasado a la sangre en el 100% de los casos, pero mientras que (5/1.25) mg/kg de amoxicilina/clavulánico son capaces de erradicarlo tras dos dosis, seis dosis de 50 mg/kg de ciprofloxacino no lo son.

2.6.2. Presencia de *S. pneumoniae* serotipo 6 en sangre

En la tabla 15, se refleja el número de animales que presentaron un hemocultivo positivo para este microorganismo respecto del total de animales sacrificados a cada tiempo,

para aquellos animales que no recibieron tratamiento (controles) y tras el tratamiento con amoxicilina/clavulánico y ciprofloxacino.

Como se puede observar, en los ratones que no recibieron tratamiento el paso de *S. pneumoniae* serotipo 6 a la sangre se había producido a las 19 horas p.i. en el 66.66% (2/3) de los animales, no alcanzándose el 100% (3/3) hasta las 27-43 horas p.i., y a partir de ese momento el microorganismo permaneció en sangre en el 100% de los ratones hasta que se produjo su muerte. Esto indica que junto al proceso neumónico el animal sufre un proceso bacteriémico, y que aunque el proceso bacteriémico que produce esta cepa es más lento que el producido por la del serotipo 3, es probable que la muerte del animal se produzca por la suma de ambos.

El tratamiento bien con amoxicilina/clavulánico o con ciprofloxacino se inicia cuando el microorganismo ha pasado a la sangre en el 66.66% de los casos, y mientras que (25/6.25) mg/kg de amoxicilina/clavulánico son capaces de erradicarlo tras cuatro dosis, el tratamiento con seis dosis de 50 mg/kg de ciprofloxacino no impide que el porcentaje aumente hasta el 100%, no volviendo a bajar este al 66.66% hasta después de la sexta dosis.

2.6.3. Presencia de *S. pneumoniae* serotipo 9 en sangre

En la tabla 16, se refleja el número de animales que presentaron un hemocultivo positivo para este microorganismo respecto del total de animales sacrificados a cada tiempo, para aquellos animales que no recibieron tratamiento (controles) y tras el tratamiento con amoxicilina/clavulánico y ciprofloxacino.

Como se puede observar al igual que ocurría con la cepa del serotipo 3, en los ratones que no recibieron tratamiento el paso de *S. pneumoniae* serotipo 9 a la sangre ya se había producido a las 19 horas p.i. en el 100% (3/3) de los animales, y el microorganismo permaneció en sangre en el 100% de los ratones hasta que se produjo su muerte. Esto indica que junto al proceso neumónico el animal sufre un proceso bacteriémico, siendo probable que la muerte del animal se produzca por la suma de ambos.

El tratamiento bien con amoxicilina/clavulánico o con ciprofloxacino se inicia cuando el microorganismo ya ha pasado a la sangre en el 100% de los casos, pero mientras que (50/12.5) mg/kg de amoxicilina/clavulánico son capaces de erradicarlo tras seis dosis, el

tratamiento con 50 mg/kg de ciprofloxacino sólo logra reducir el porcentaje al 66.66% (2/3) tras la 6ª dosis.

En la figura 31 se representa el porcentaje de hemocultivos positivos a las 91 horas p.i., o lo que es lo mismo 12 horas tras la 6ª y última dosis, en animales infectados con cada una de las cepas ensayadas y tratados con 5/1.25, 25/6.25 y 50/12.5 mg/kg de amoxicilina/clavulánico, y 50 mg/kg de ciprofloxacino. Sólo amoxicilina/clavulánico es capaz de erradicar la presencia de los microorganismos de la sangre.

2.7. NIVELES DE ANTIMICROBIANO EN SUERO Y PULMON

2.7.1. Rectas estándar

Las rectas estándar de amoxicilina y ciprofloxacino frente a las cepas patrón *M. luteus* ATCC 9341 y *E. coli* ATCC 25922 se encuentran en la figura 32. Las ecuaciones de regresión lineal basadas en el método de mínimos cuadrados fueron las siguientes:

Amoxicilina

$$Y = 12.9 X + 55.39$$

$$(r^2 = 0.98)$$

Ciprofloxacino

$$Y = 7.08 X + 34.6$$

$$(r^2 = 0.97)$$

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

Según estos resultados existe una muy buena correlación lineal entre las dos variables X e Y, ya que los coeficientes de correlación (r^2) son muy cercanos a 1, lo que se confirma en las gráficas de la figura 32, que muestran una gran proximidad de las nubes de puntos a las rectas de mínimos cuadrados.

2.7.2. Curvas de concentración de antimicrobiano en suero y pulmón de ratón sin infectar e infectado.

2.7.2.1. Amoxicilina

Las figuras 33, 34 y 35 muestran las curvas de concentración frente al tiempo de amoxicilina en suero y pulmón de ratón sin infectar e infectado tras la administración de una dosis de 5, 25 y 50 mg/kg respectivamente.

2.7.2.2. Ciprofloxacino

La figura 36 muestra las curvas de concentración frente al tiempo de ciprofloxacino en suero y pulmón de ratón sin infectar e infectado tras la administración de una dosis de 50 mg/kg.

2.7.3. Parámetros farmacocinéticos

La tabla 17, recoge los valores de los parámetros farmacocinéticos calculados a partir de las curvas de concentración frente al tiempo para cada dosis de amoxicilina y ciprofloxacino empleadas.

2.7.3.1. Amoxicilina

Como se puede observar en la tabla 17, las concentraciones máximas se alcanzaron generalmente a las 0.5 h. Las $C_{m\acute{a}x}$ fueron mayores en suero que en pulmón, excepto en los pulmones de ratones infectados (PI) para 50 mg/kg. Las $C_{m\acute{a}x}$ fueron mayores o iguales en los sueros y pulmones de los ratones controles (sin infectar) que en los de los infectados, excepto para la dosis de 50 mg/kg de amoxicilina.

El tiempo de vida media ($T_{1/2}$) fue mayor en los sueros que en los pulmones, excepto para los infectados a la dosis de 25 mg/kg. $T_{1/2}$ fue mayor o igual en los sueros y pulmones de los ratones sin infectar (controles) que en los de los infectados.

El ABC fue dosis dependiente en el caso de amoxicilina, obteniéndose unos valores significativamente mayores en los pulmones de ratones infectados (PI) que en los pulmones de controles con las dosis de 25 y 50 mg/kg.

2.7.3.2. Ciprofloxacino

Como se puede observar en la tabla 17, las concentraciones máximas se alcanzaron generalmente a las 0.5 h. Las $C_{m\acute{a}x}$ fueron mayores en los sueros y pulmones de los ratones controles (sin infectar) que en los de los infectados.

El tiempo de vida media ($T_{1/2}$) fue menor o igual en los sueros que en los pulmones. $T_{1/2}$ fue mayor o igual en los sueros de los ratones sin infectar (controles) que en los de los infectados, pero fue menor en los pulmones de los controles que en los de los infectados.

El ABC para ciprofloxacino es elevado tanto en suero como en pulmón.

V. TABLAS Y FIGURAS

ANTIMICROBIANO	MICROORGANISMO	CMI (mg/l)	CMB (mg/l)
Amoxicilina	<i>S. pneumoniae</i> serotipo 3	0.03	0.03
	<i>S. pneumoniae</i> serotipo 6	0.25	0.25
	<i>S. pneumoniae</i> serotipo 9	2	2
Ac. clavulánico	<i>S. pneumoniae</i> serotipo 3	16	32
	<i>S. pneumoniae</i> serotipo 6	64	>128
	<i>S. pneumoniae</i> serotipo 9	>128	>128
Amox/Clav (4:1)	<i>S. pneumoniae</i> serotipo 3	0.03	0.03
	<i>S. pneumoniae</i> serotipo 6	0.25	0.25
	<i>S. pneumoniae</i> serotipo 9	2	2
Ciprofloxacino	<i>S. pneumoniae</i> serotipo 3	1	2
	<i>S. pneumoniae</i> serotipo 6	1	2
	<i>S. pneumoniae</i> serotipo 9	0.5	1

Tabla 1. CMI y CMB de amoxicilina, ácido clavulánico, amoxicilina/clavulánico (4:1) y ciprofloxacino frente a cepas de *S. pneumoniae* del serotipo 3, 6 y 9.

Figura 1.a.

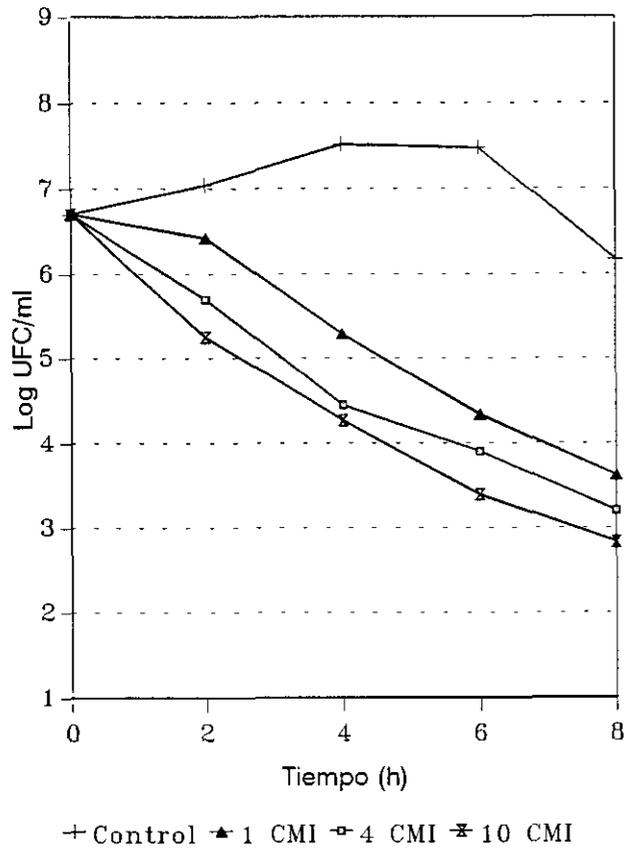


Figura 1.b.

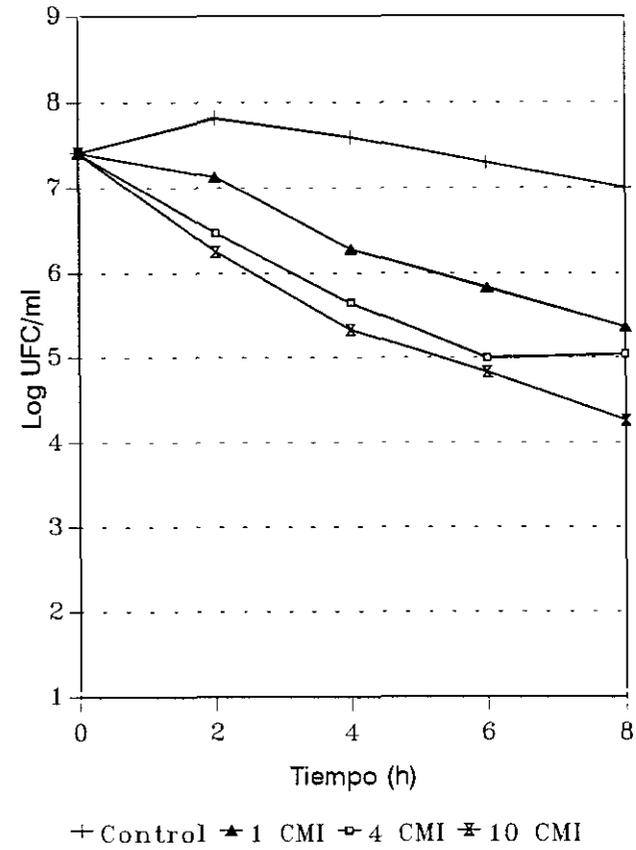


Figura 1. Curvas de letalidad de *S. pneumoniae* serotipo 3 en presencia de 1, 4 y 10 CMI de amoxicilina/clavulánico (4:1) (Fig. 1.a) y ciprofloxacino (Fig. 1.b).

TIEMPO (h)	CONTROL	AMOXICILINA/CLAVULANICO		
		1 CMI	4 CMI	10 CMI
2	0.34 ± 0.04 ^a	- 0.28 ± 0.01 ^{b, c}	- 1 ± 0.03	- 1.45 ± 0.14
4	0.82 ± 0.1 ^a	- 1.41 ± 0.04 ^{b, c, e}	- 2.25 ± 0.06	- 2.43 ± 0.04 ^e
6	0.78 ± 0.06 ^a	- 2.36 ± 0.06 ^{b, c, e}	- 2.8 ± 0.07 ^d	- 3.31 ± 0.04
8	- 0.53 ± 0.15 ^a	- 3.08 ± 0.01 ^{c, e}	- 3.5 ± 0.14 ^e	- 3.87 ± 0.04 ^e
TIEMPO (h)	CONTROL	CIPROFLOXACINO		
		1 CMI	4 CMI	10 CMI
2	0.41 ± 0.05 ^a	- 0.28 ± 0.14 ^{b, c}	- 0.94 ± 0.08	- 1.17 ± 0.11
4	0.19 ± 0.09 ^a	- 1.13 ± 0.07 ^{b, c}	- 1.77 ± 0.14	- 2.08 ± 0.06
6	- 0.11 ± 0.03 ^a	- 1.59 ± 0.04 ^{b, c}	- 2.41 ± 0.11	- 2.59 ± 0.14
8	- 0.41 ± 0.2 ^a	- 2.06 ± 0.01 ^{b, c}	- 2.38 ± 0.04 ^d	- 3.16 ± 0.06

Tabla 2. Cambios en la viabilidad ± DE de *S. pneumoniae* serotipo 3 a diferentes tiempos frente a las concentraciones de 1, 4 y 10 CMI de amoxicilina/clavulánico (4:1) y ciprofloxacino.

^a Existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre bacterias control y tratadas.

^b Existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre 1 y 4 CMI.

^c Existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre 1 y 10 CMI.

^d Existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre 4 y 10 CMI.

^e Existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre la exposición a amoxicilina/clavulánico o ciprofloxacino.

Figura 2.a.

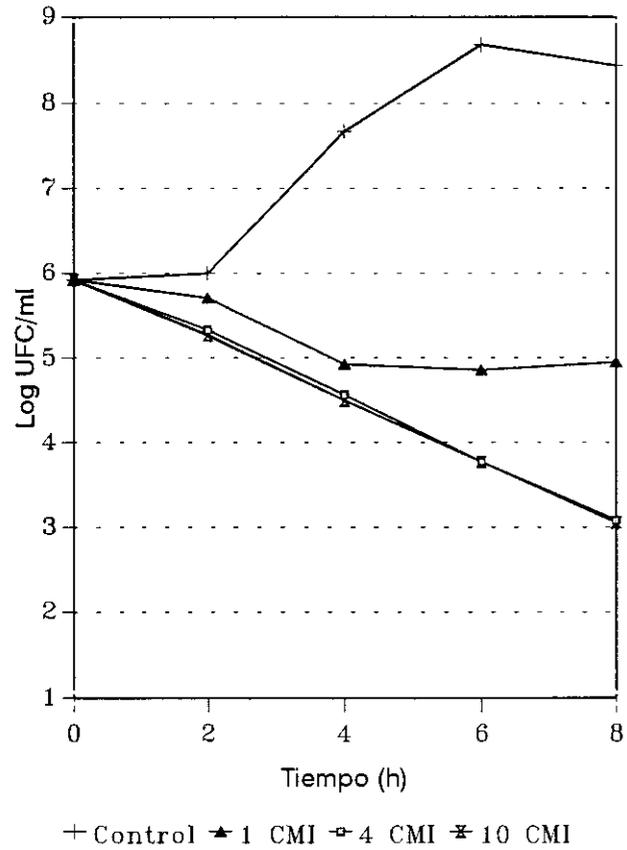


Figura 2.b.

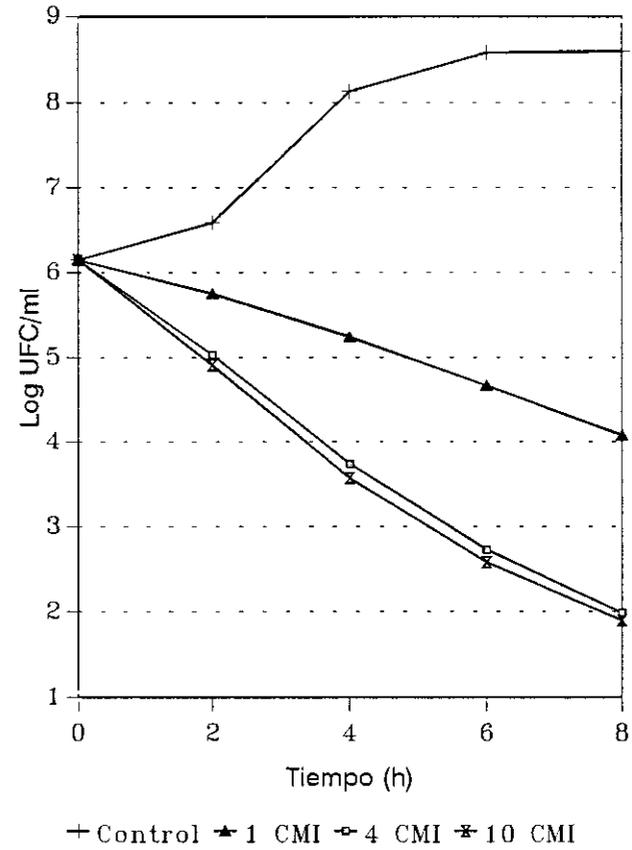


Figura 2. Curvas de letalidad de *S. pneumoniae* serotipo 6 en presencia de 1, 4 y 10 CMI de amoxicilina/clavulánico (4:1) (Fig. 2.a) y ciprofloxacino (Fig. 2.b).

		AMOXICILINA/CLAVULANICO		
TIEMPO (h)	CONTROL	1 CMI	4 CMI	10 CMI
2	0.02 ± 0.01 ^a	- 0.22 ± 0.01	- 0.6 ± 0.07 ^c	- 0.65 ± 0.14 ^c
4	1.75 ± 0.05 ^a	- 0.99 ± 0.15	- 1.36 ± 0.15 ^c	- 1.43 ± 0.13 ^c
6	2.76 ± 0.17 ^a	- 1.07 ± 0.13 ^{b, c}	- 2.15 ± 0.1 ^e	- 2.15 ± 0.06 ^e
8	2.52 ± 0.11 ^a	- 0.98 ± 0.13 ^{b, c, e}	- 2.85 ± 0.12 ^e	- 2.87 ± 0.08 ^e
		CIPROFLOXACINO		
TIEMPO (h)	CONTROL	1 CMI	4 CMI	10 CMI
2	0.44 ± 0.05 ^a	- 0.4 ± 0.04 ^{b, c}	- 1.12 ± 0.11	- 1.24 ± 0.09
4	1.98 ± 0.03 ^a	- 0.91 ± 0.01 ^{b, c}	- 2.41 ± 0.15	- 2.58 ± 0.19
6	2.43 ± 0.08 ^a	- 1.48 ± 0.2 ^{b, c}	- 3.42 ± 0.06	- 3.57 ± 0.11
8	2.45 ± 0.04 ^a	- 2.07 ± 0.14 ^{b, c}	- 4.16 ± 0.19	- 4.25 ± 0.21

Tabla 3. Cambios en la viabilidad ± DE de *S. pneumoniae* serotipo 6 a diferentes tiempos frente a las concentraciones de 1, 4 y 10 CMI de amoxicilina/clavulánico (4:1) y ciprofloxacino.

^a Existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre bacterias control y tratadas.

^b Existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre 1 y 4 CMI.

^c Existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre 1 y 10 CMI.

^d Existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre 4 y 10 CMI.

^e Existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre la exposición a amoxicilina/clavulánico o ciprofloxacino.

Figura 3.a.

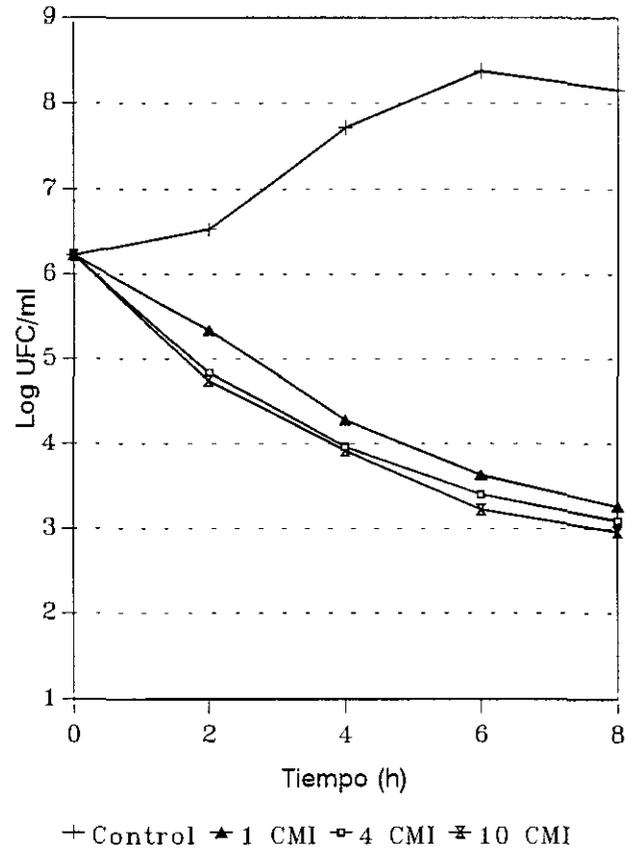


Figura 3.b.

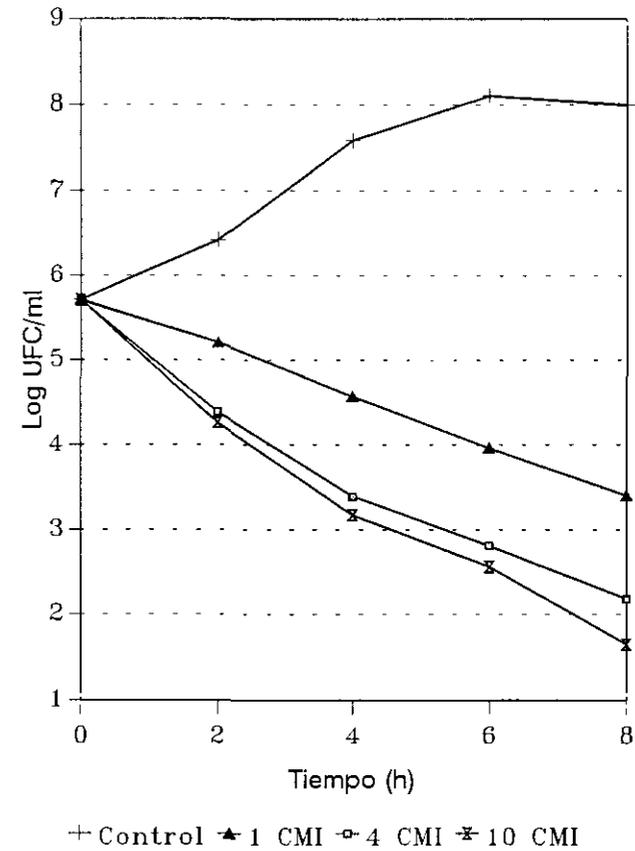


Figura 3. Curvas de letalidad de *S. pneumoniae* serotipo 9 en presencia de 1, 4 y 10 CMI de amoxicilina/clavulánico (4:1) (Fig. 3.a) y ciprofloxacino (Fig. 3.b).

TIEMPO (h)	CONTROL	AMOXICILINA/CLAVULANICO		
		1 CMI	4 CMI	10 CMI
2	0.31 ± 0.04 ^a	- 0.88 ± 0.03 ^{c, e}	- 1.38 ± 0.1	- 1.48 ± 0.06
4	1.5 ± 0.02 ^a	- 1.94 ± 0.08 ^e	- 2.26 ± 0.01	- 2.3 ± 0.14
6	2.16 ± 0.1 ^a	- 2.59 ± 0.07 ^e	- 2.82 ± 0.11	- 3 ± 0.14
8	1.94 ± 0.09 ^a	- 2.96 ± 0.06 ^{c, e}	- 3.13 ± 0.1	- 3.26 ± 0.06 ^e
TIEMPO (h)	CONTROL	CIPROFLOXACINO		
		1 CMI	4 CMI	10 CMI
2	0.71 ± 0.1 ^a	- 0.51 ± 0.06 ^{b, c}	- 1.32 ± 0.11	- 1.45 ± 0.07
4	1.88 ± 0.1 ^a	- 1.14 ± 0.08 ^{b, c}	- 2.33 ± 0.1	- 2.55 ± 0.07
6	2.4 ± 0.06 ^a	- 1.76 ± 0.06 ^{b, c}	- 2.91 ± 0.13	- 3.16 ± 0.06
8	2.29 ± 0.07 ^a	- 2.31 ± 0.13 ^{b, c}	- 3.54 ± 0.1 ^d	- 4.06 ± 0.06

Tabla 4. Cambios en la viabilidad ± DE de *S. pneumoniae* serotipo 9 a diferentes tiempos frente a las concentraciones de 1, 4 y 10 CMI de amoxicilina/clavulánico (4:1) y ciprofloxacino.

^a Existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre bacterias control y tratadas.

^b Existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre 1 y 4 CMI.

^c Existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre 1 y 10 CMI.

^d Existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre 4 y 10 CMI.

^e Existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre la exposición a amoxicilina/clavulánico o ciprofloxacino.

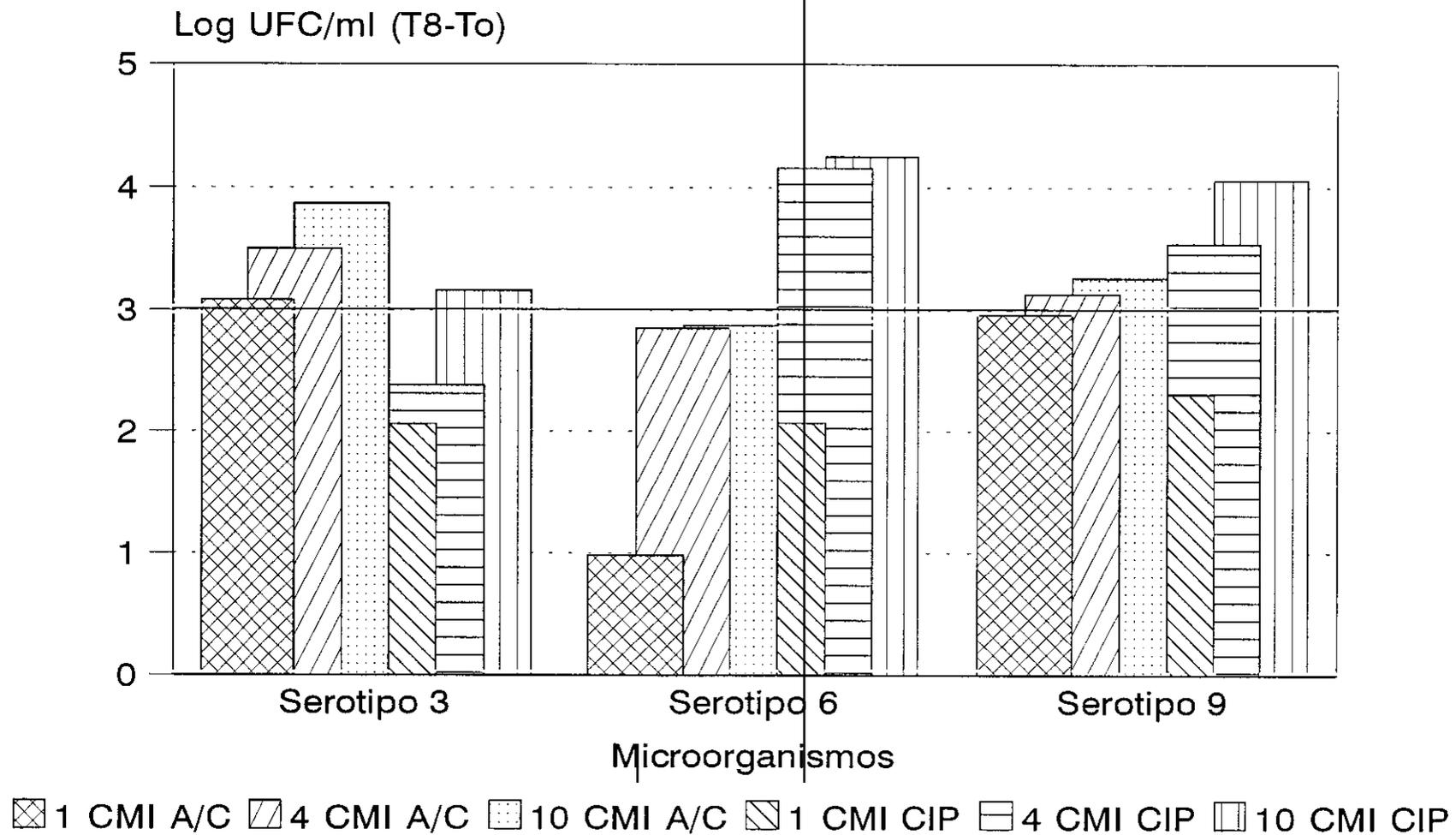
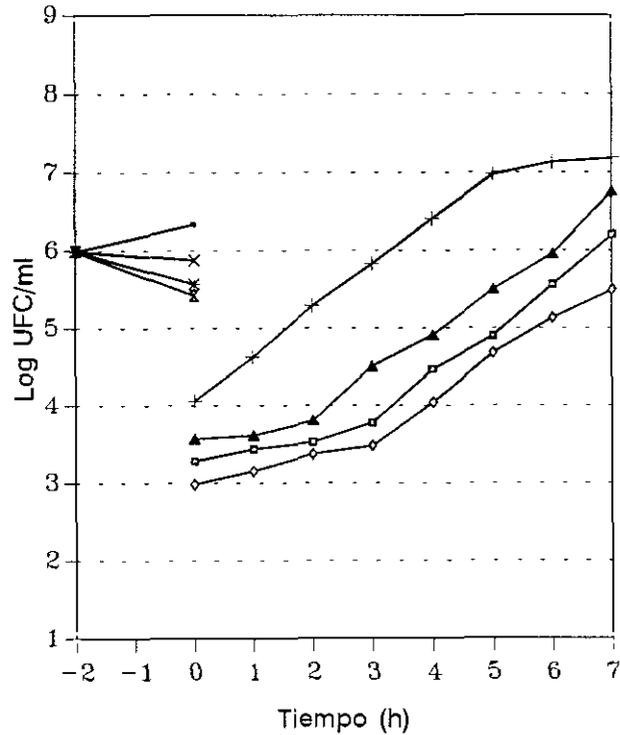


Figura 4. Cambios en la viabilidad de las tres cepas de *S. pneumoniae* en la hora 8ª de exposición a 1, 4 y 10 CMI de amoxicilina/clavulánico (A/C) y ciprofloxacino (CIP).

	AMOXICILINA/CLAVULANICO			CIPROFLOXACINO		
	1 CMI	4 CMI	10 CMI	1 CMI	4 CMI	10 CMI
Serotipo 3	7.72	6.53	5.27	-	-	7.47
Serotipo 6	-	-	-	-	5.19	4.86
Serotipo 9	-	7.38	6.19	-	6.36	5.55

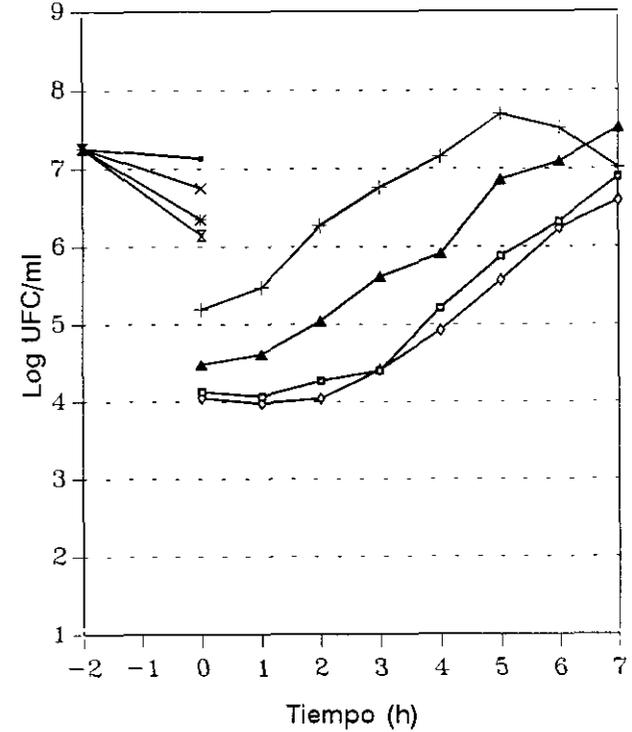
Tabla 5. Tiempo que tardan en descender 3 log₁₀ UFC/ml. Efecto bactericida.

Figura 5.a



— Control * 1 CMI * 4 CMI * 10 CMI
 + Dil control + Dil 1 CMI + Dil 4 CMI + Dil 10 CMI

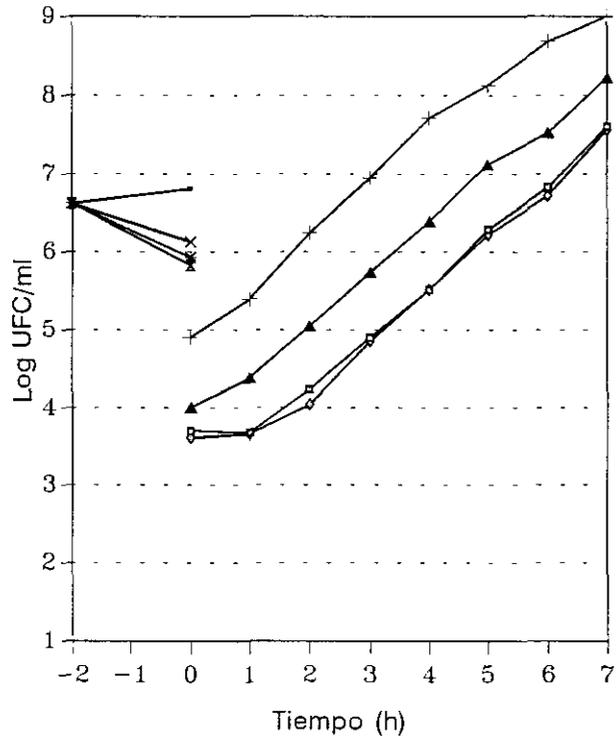
Figura 5.b



— Control * 1 CMI * 4 CMI * 10 CMI
 + Dil Control + Dil 1 CMI + Dil 4 CMI + Dil 10 CMI

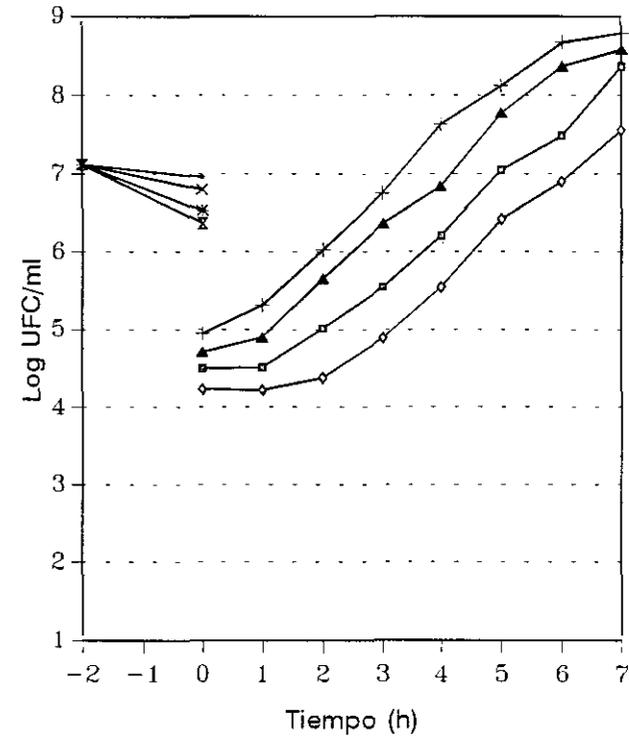
Figura 5. Efecto postantibiótico de amoxicilina/clavulánico (Fig. 5.a) y ciprofloxacino (Fig. 5.b), a las concentraciones de 1, 4 y 10 CMI, frente a *S. pneumoniae* serotipo 3.

Figura 6.a



— Control * 1 CMI * 4 CMI * 10 CMI
 + Dil control ▲ Dil 1 CMI □ Dil 4 CMI ◇ Dil 10 CMI

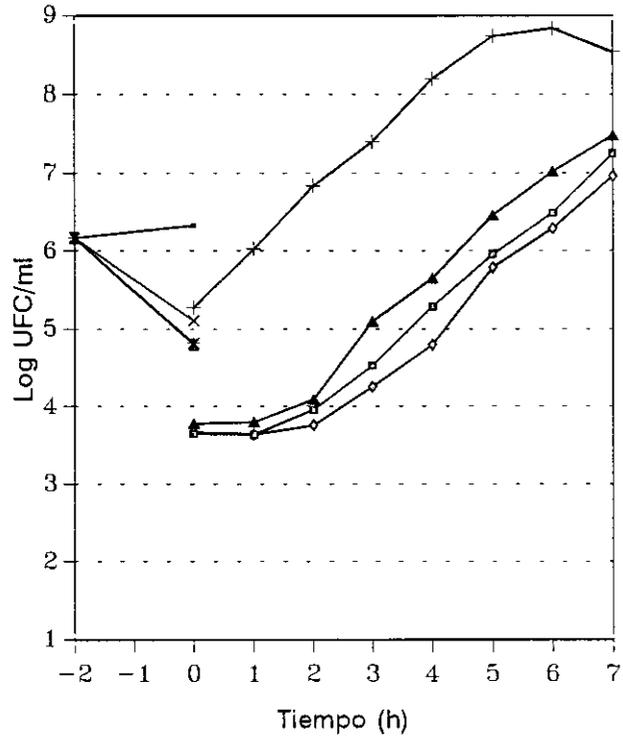
Figura 6.b



— Control * 1 CMI * 4 CMI * 10 CMI
 + Dil Control ▲ Dil 1 CMI □ Dil 4 CMI ◇ Dil 10 CMI

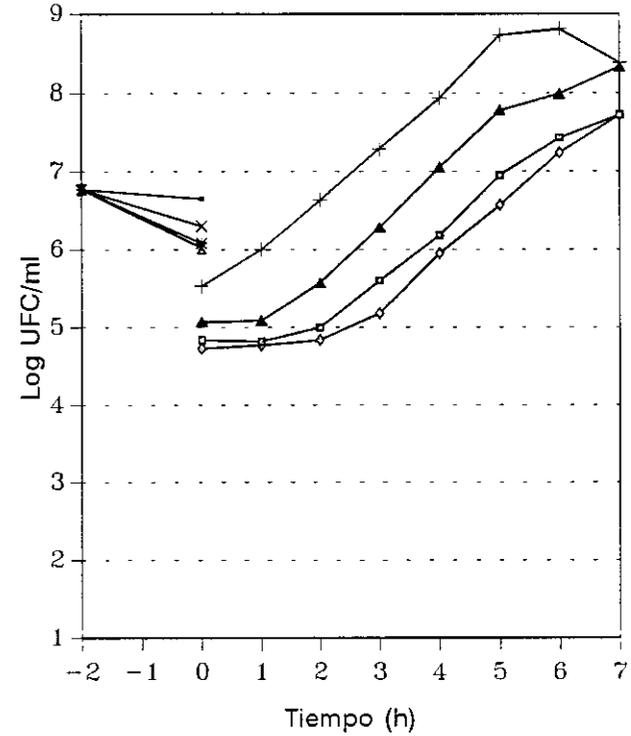
Figura 6. Efecto postantibiótico de amoxicilina/clavulánico (Fig. 6.a) y ciprofloxacino (Fig. 6.b), a las concentraciones de 1, 4 y 10 CMI, frente a *S. pneumoniae* serotipo 6.

Figura 7.a



— Control * 1 CMI * 4 CMI * 10 CMI
 + Dil Control ▲ Dil 1 CMI ◻ Dil 4 CMI ◊ Dil 10 CMI

Figura 7.b



— Control * 1 CMI * 4 CMI * 10 CMI
 + Dil Control ▲ Dil 1 CMI ◻ Dil 4 CMI ◊ Dil 10 CMI

Figura 7. Efecto postantibiótico de amoxicilina/clavulánico (Fig. 7.a) y ciprofloxacino (Fig. 7.b), a las concentraciones de 1, 4 y 10 CMI, frente a *S. pneumoniae* serotipo 9.

	AMOXICILINA/CLAVULANICO		
	1 CMI	4 CMI	10 CMI
Serotipo 3	0.96 ± 0.5 ^b	1.45 ± 0.65	1.69 ± 0.57
Serotipo 6	0.38 ± 0.15 ^{a, b}	1.26 ± 0.17	1.23 ± 0.10 ^d
Serotipo 9	1.52 ± 0.19 ^{b, d}	1.79 ± 0.04 ^d	2.2 ± 0.23
	CIPROFLOXACINO		
	1 CMI	4 CMI	10 CMI
Serotipo 3	1.42 ± 0.54 ^b	2.46 ± 0.46	2.91 ± 0.59
Serotipo 6	0.28 ± 0.1 ^{a, b}	1.37 ± 0.21	1.98 ± 0.33
Serotipo 9	0.71 ± 0.15 ^{a, b}	1.36 ± 0.17	1.72 ± 0.19

Tabla 6. Efecto postantibiótico *in vitro* (en horas ± DE) de amoxicilina/clavulánico (4:1) y ciprofloxacino frente a *S. pneumoniae* serotipo 3, 6 y 9.

^a Existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre 1 y 4 CMI.

^b Existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre 1 y 10 CMI.

^c Existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre 4 y 10 CMI.

^d Existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre la exposición a amoxicilina/clavulánico o ciprofloxacino.

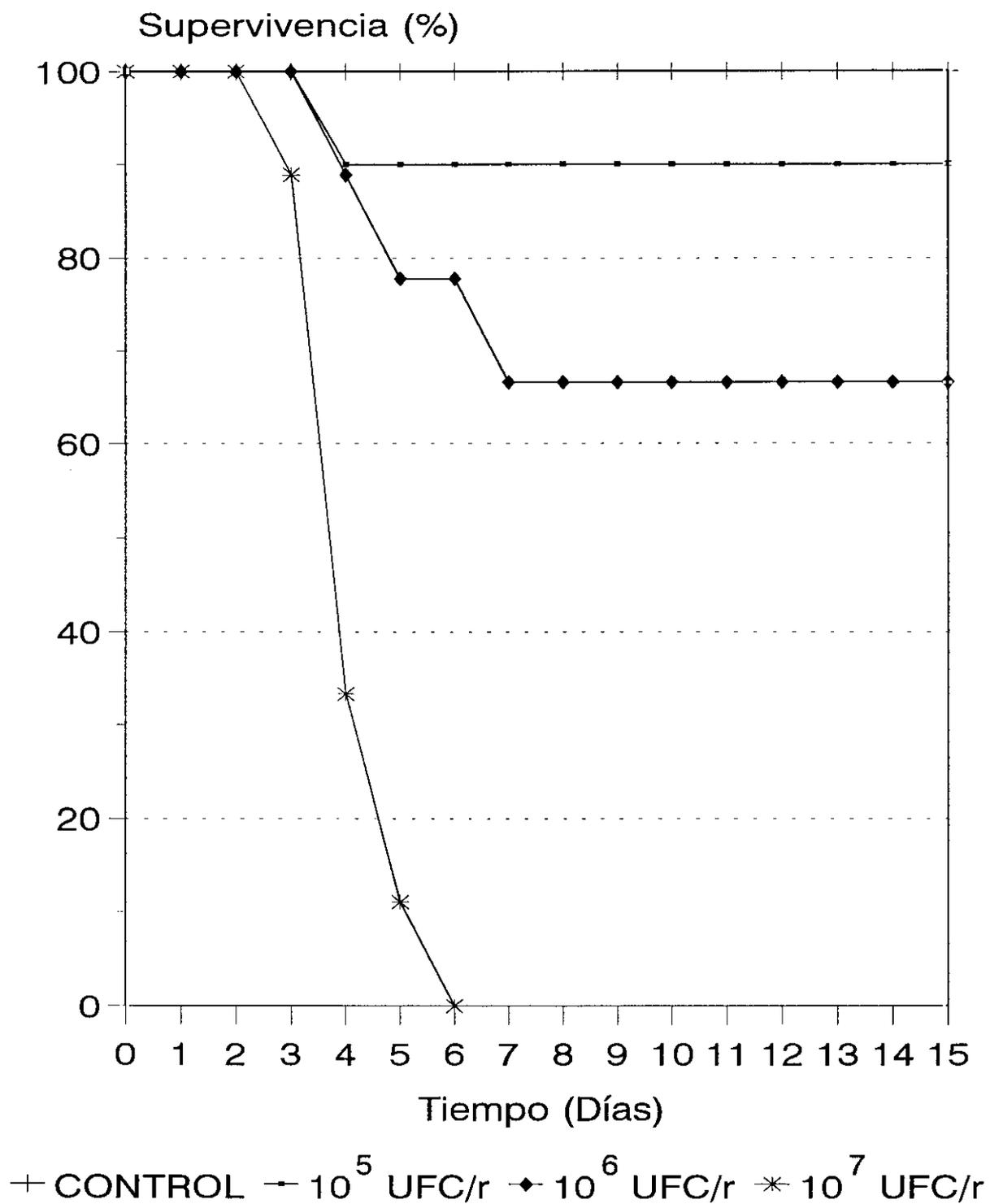


Figura 9. Supervivencia (en %) de animales inoculados con diferentes tamaños de inóculo (UFC/r) de *S. pneumoniae* serotipo 6.

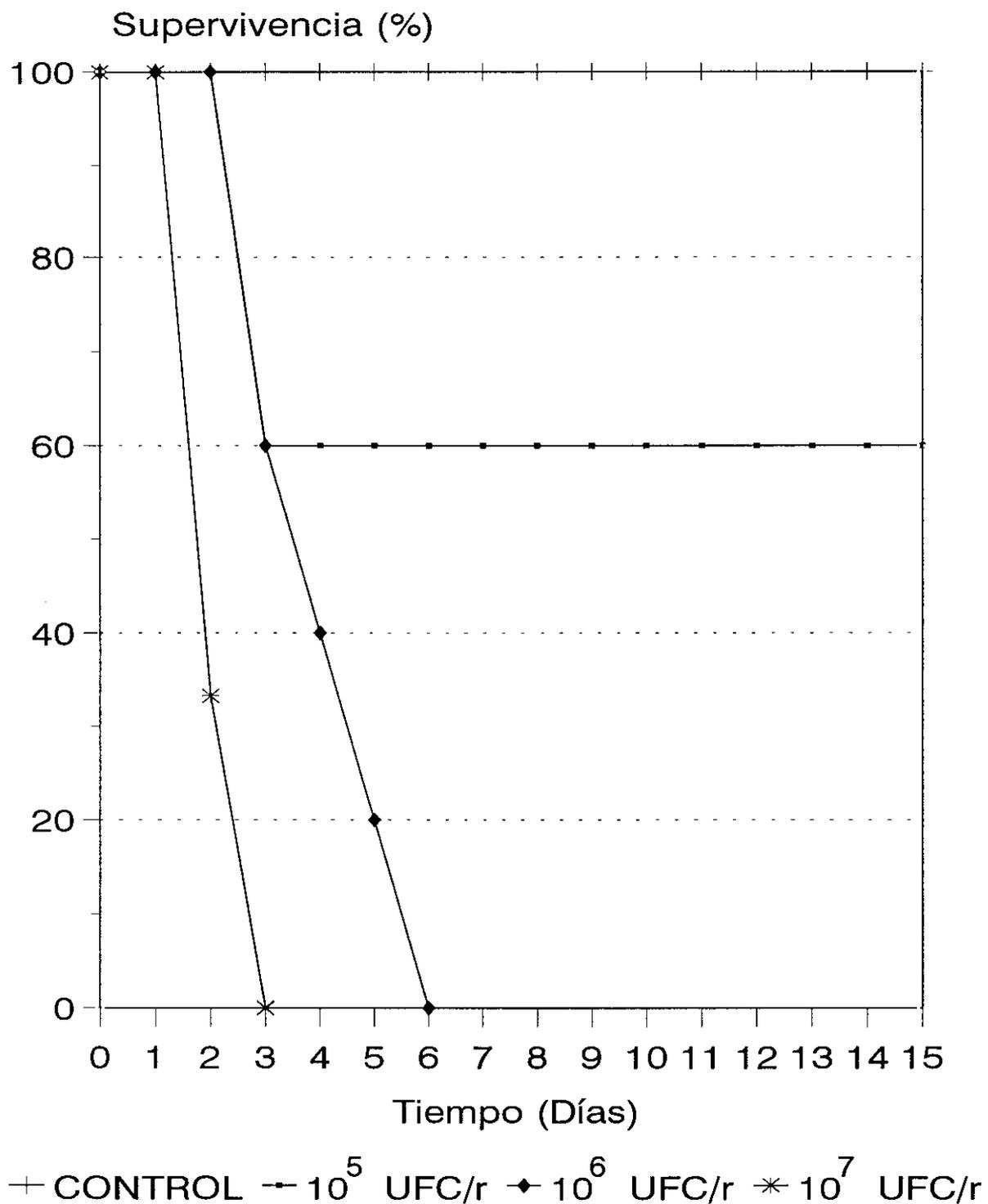


Figura 10. Supervivencia (en %) de animales inoculados con diferentes tamaños de inóculo (UFC/r) de *S. pneumoniae* serotipo 9.

INOCULO (UFC/r)	SUPERVIVENCIA (%)		
	<i>S. pneumoniae</i> ser. 3	<i>S. pneumoniae</i> ser. 6	<i>S. pneumoniae</i> ser. 9
10 ³	60	—	—
10 ⁴	12.5	—	—
10 ⁵	0	90	60
10 ⁶	0	66.67	0
10 ⁷	—	0	0

Tabla 7. Porcentaje de supervivencia en el día 15 p.i. para las diferentes cepas de *S. pneumoniae* utilizadas.

	<i>S. pneumoniae</i> ser 3	<i>S. pneumoniae</i> ser 6	<i>S. pneumoniae</i> ser 9
MDL	10 ⁵ UFC/r	10 ⁷ UFC/r	10 ⁶ UFC/r

Tabla 8. Mínima dosis letal (MDL) de cada cepa de *S. pneumoniae* utilizada.

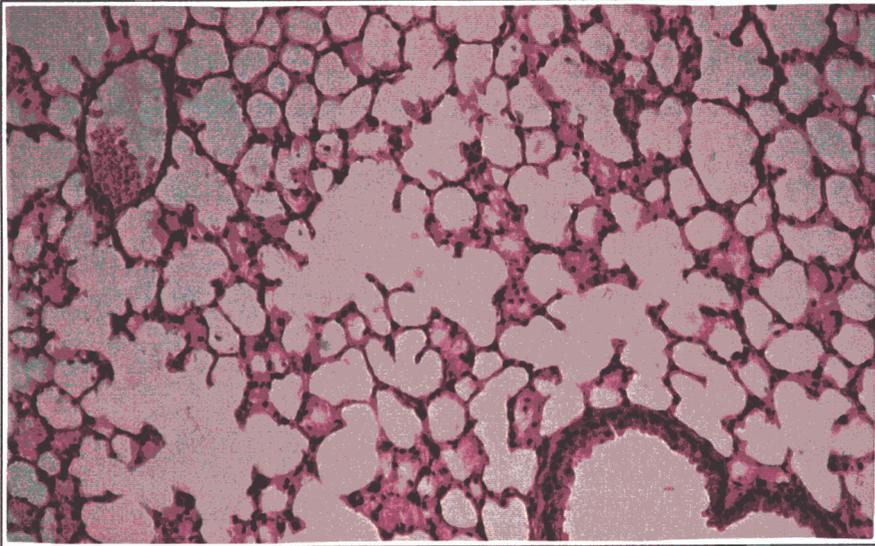


Figura 11. Lesiones histopatológicas en pulmón de ratones del grupo control.

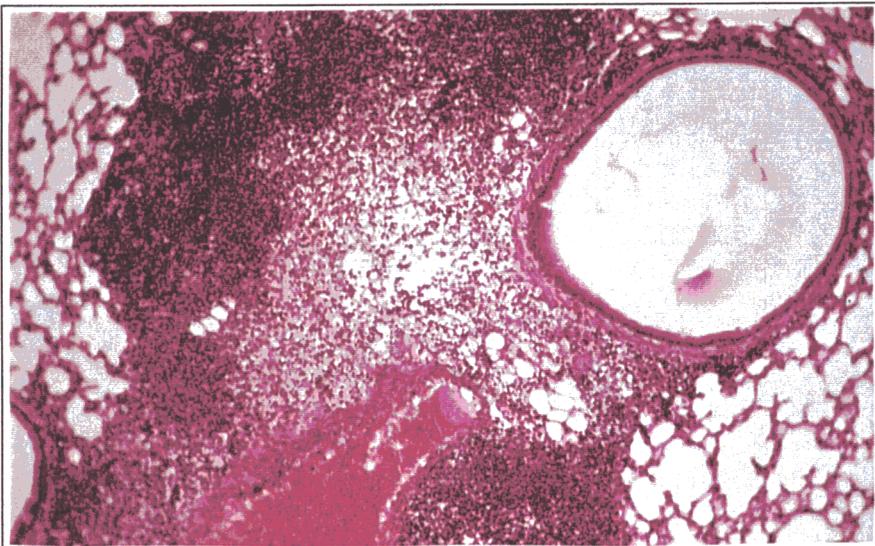


Figura 12. Lesiones histopatológicas en pulmón de ratones infectados por *S. pneumoniae* del serotipo 3.

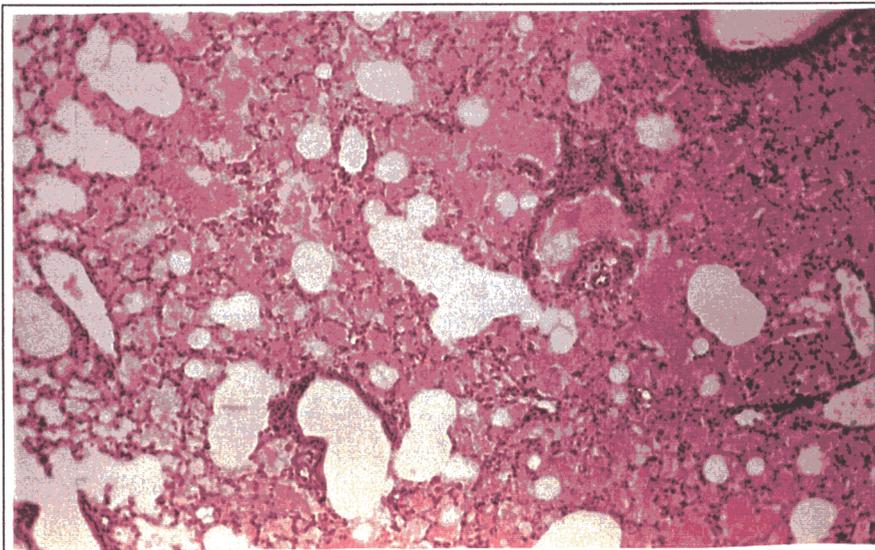
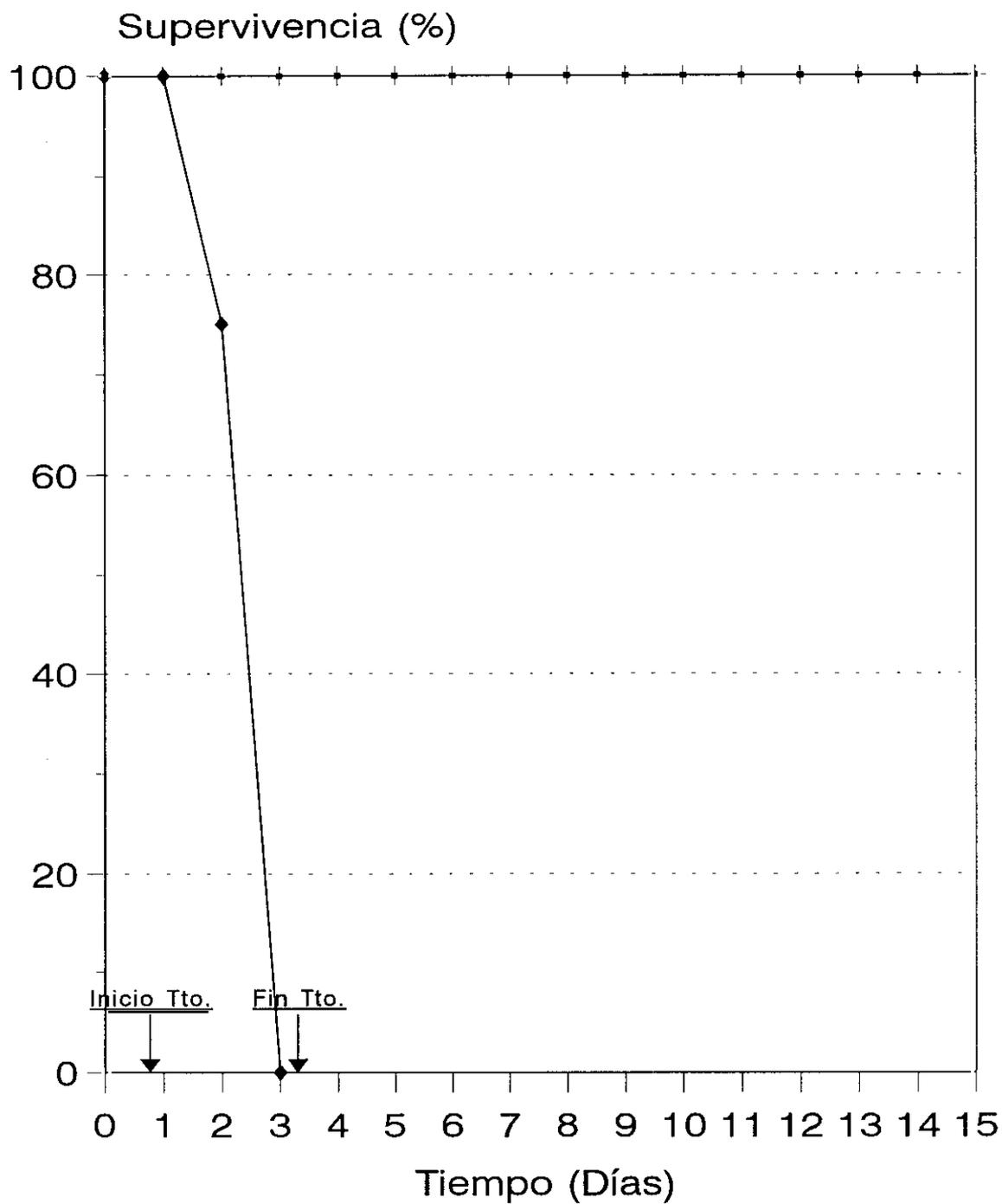
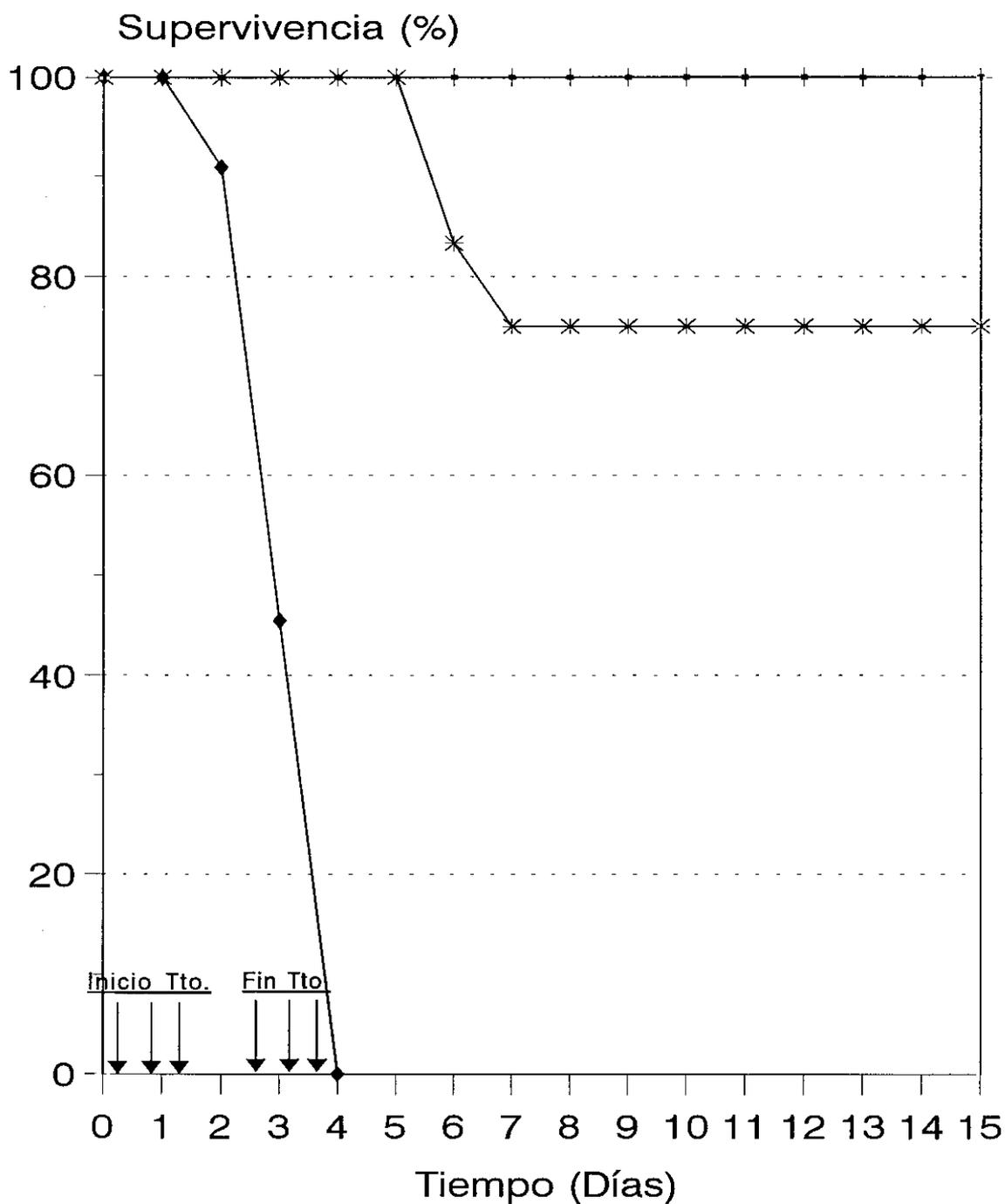


Figura 13. Lesiones histopatológicas en pulmón de ratones infectados por *S. pneumoniae* de los serotipos 6 y 9.



◆ CONTROL + T (5/1.25) mg/kg → T (10/2.5) mg/kg

Figura 14. Efecto del tratamiento con amoxicilina/clavulánico en la supervivencia de animales infectados con *S. pneumoniae* serotipo 3.



◆ CONTROL + T 5 h - T 19 h * T 31 h

Figura 15. Efecto del inicio del tratamiento (horas p.i.) con (5/1.25) mg/kg de amoxicilina/clavulánico en animales infectados con *S. pneumoniae* serotipo 3.

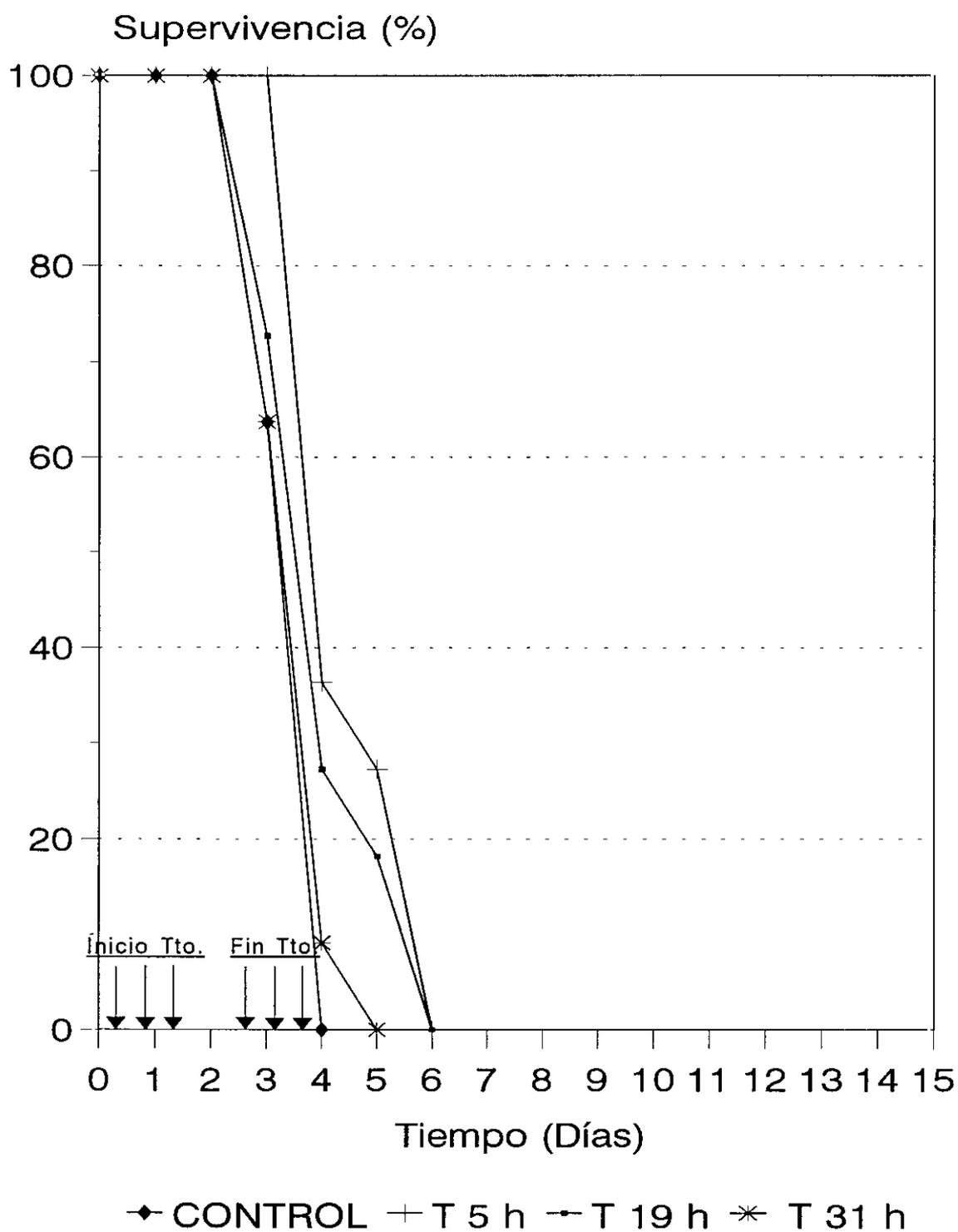


Figura 16. Efecto del tratamiento con 50 mg/kg de ciprofloxacino, iniciado a las 5, 19 y 31 horas p.i. en animales infectados con *S. pneumoniae* serotipo 3.

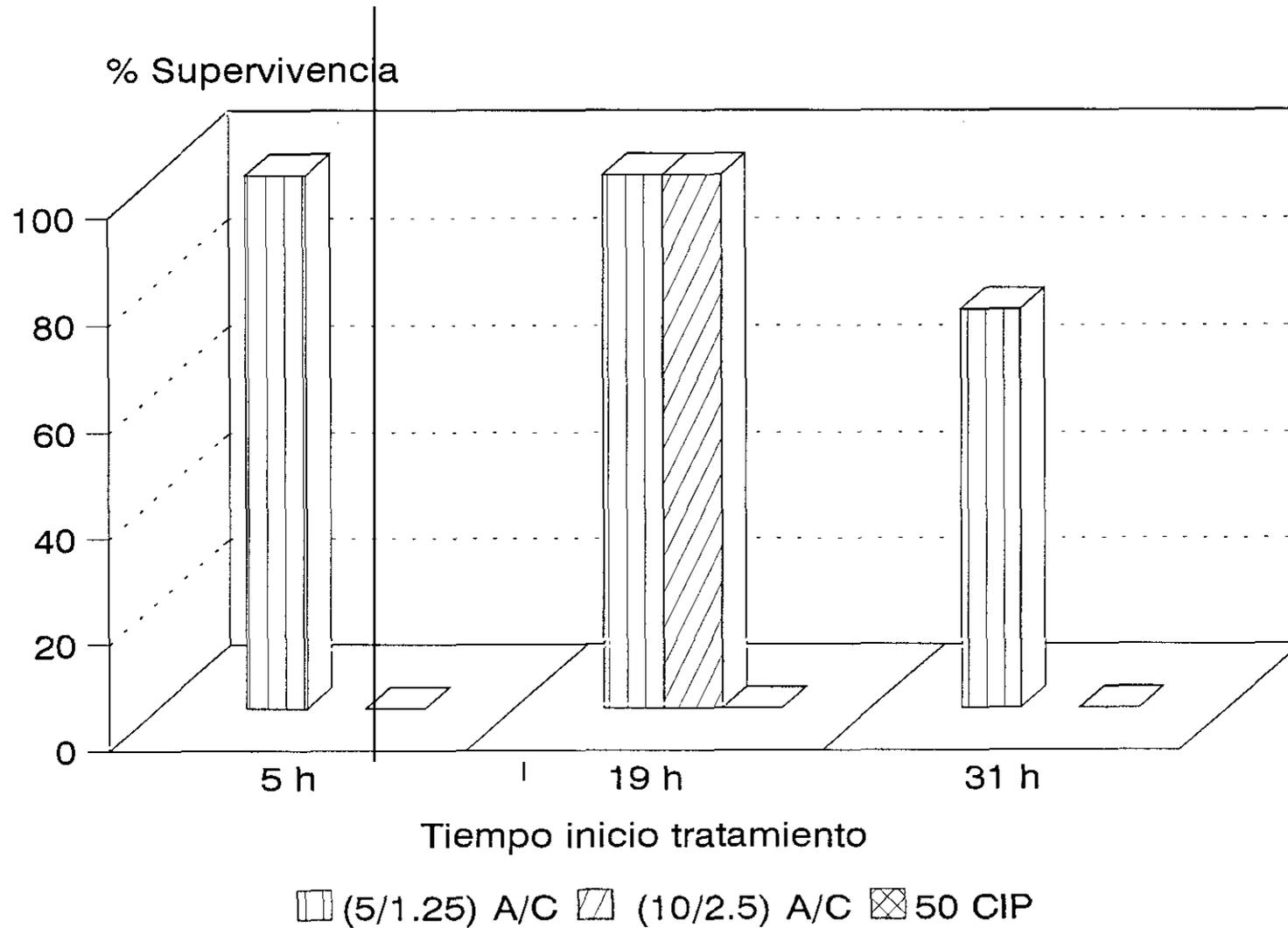


Figura 17. Efecto del tratamiento con amoxicilina/clavulánico (A/C) y ciprofloxacino (CIP) en la supervivencia final de animales infectados con *S. pneumoniae* serotipo 3.

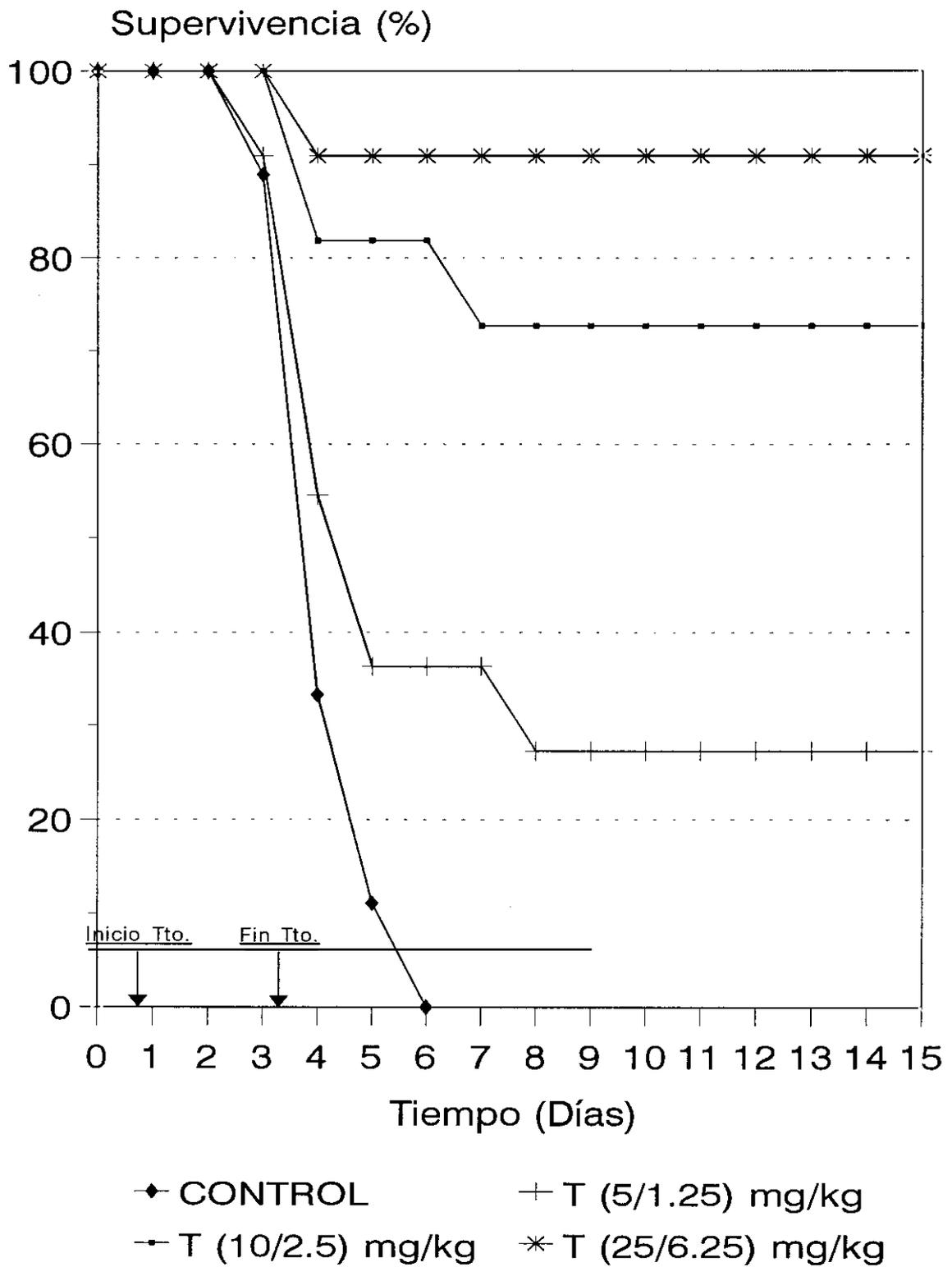


Figura 18. Efecto del tratamiento con amoxicilina/clavulánico en la supervivencia de animales infectados con *S. pneumoniae* serotipo 6.

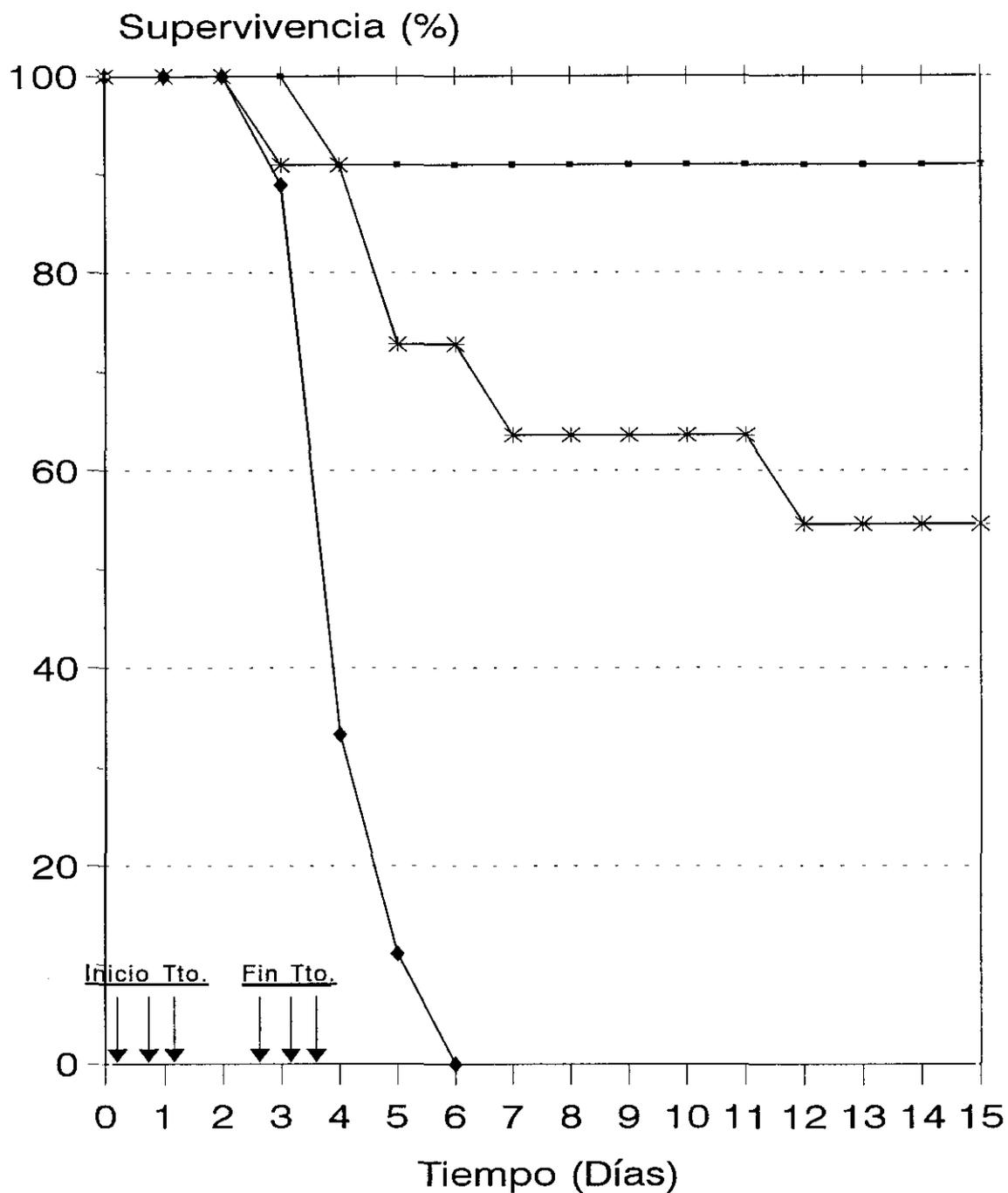


Figura 19. Efecto del inicio del tratamiento (horas p. i.) con (25/6.25) mg/kg de amoxicilina/clavulánico en animales infectados con *S. pneumoniae* serotipo 6.

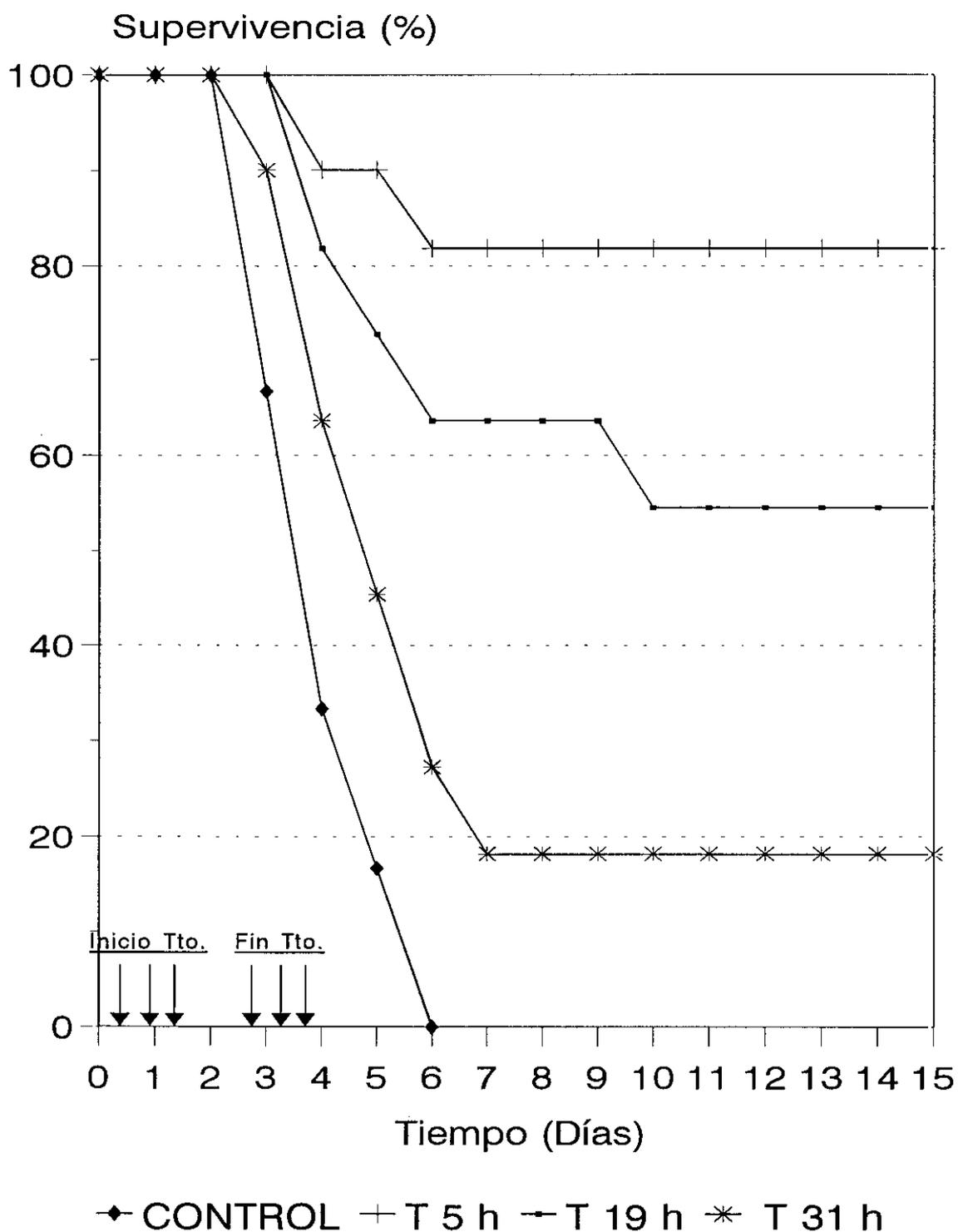


Figura 20. Efecto del tratamiento con 50 mg/kg de ciprofloxacino, iniciado a las 5, 19 y 31 horas p. i. en animales infectados con *S. pneumoniae* serotipo 6.

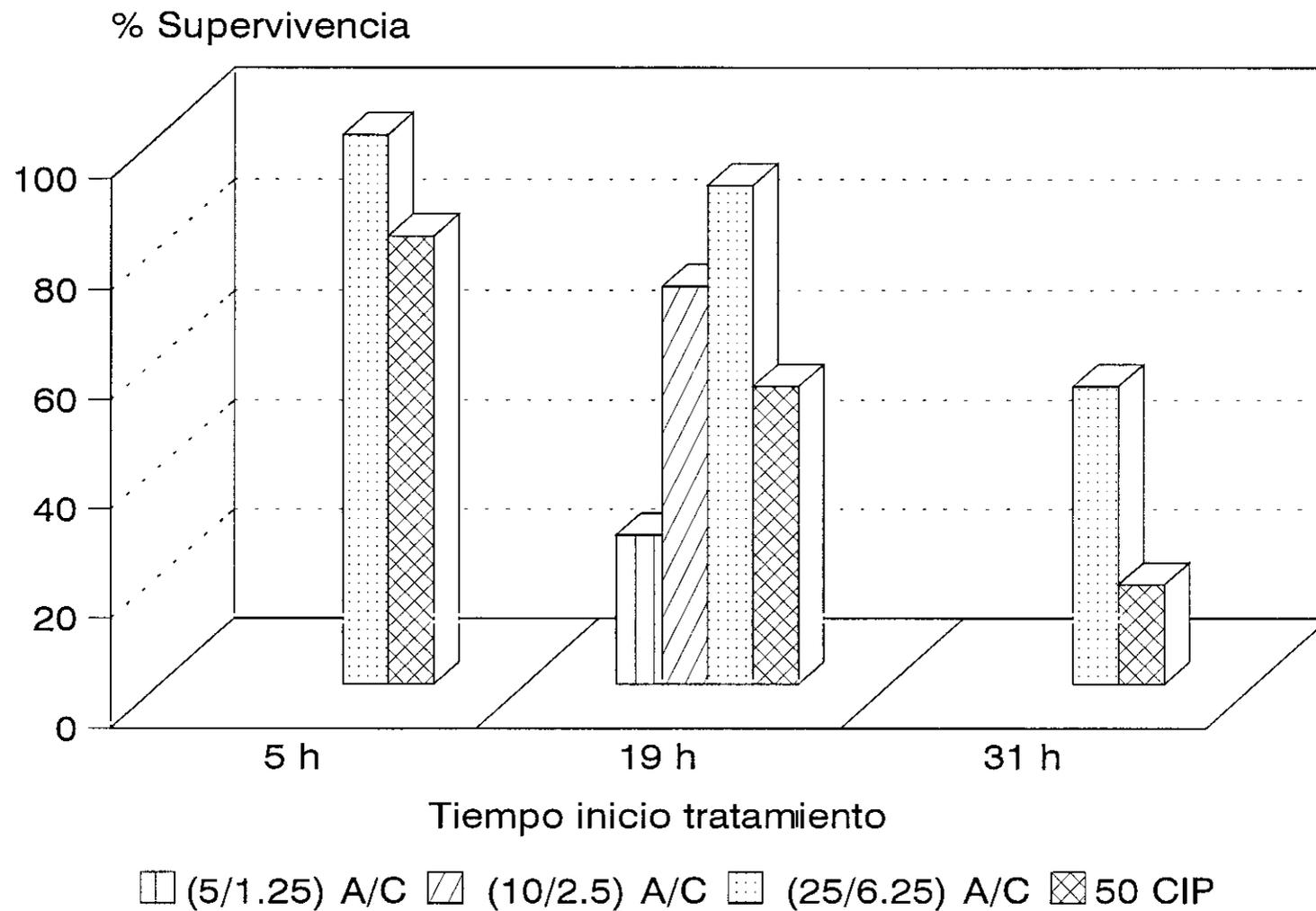


Figura 21. Efecto del tratamiento con amoxicilina/clavulánico (A/C) y ciprofloxacino (CIP) en la supervivencia final de animales infectados con *S. pneumoniae* serotipo 6.

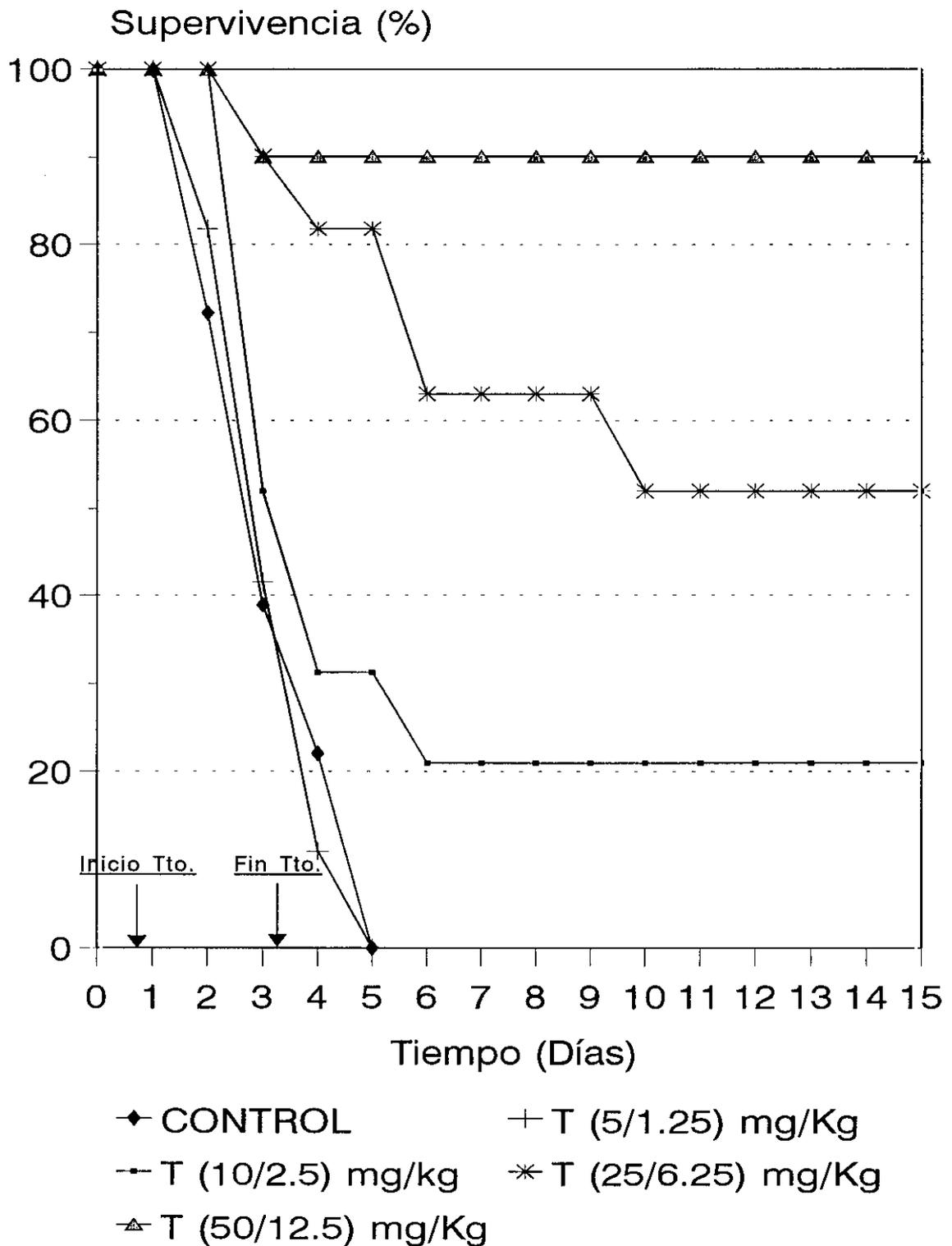
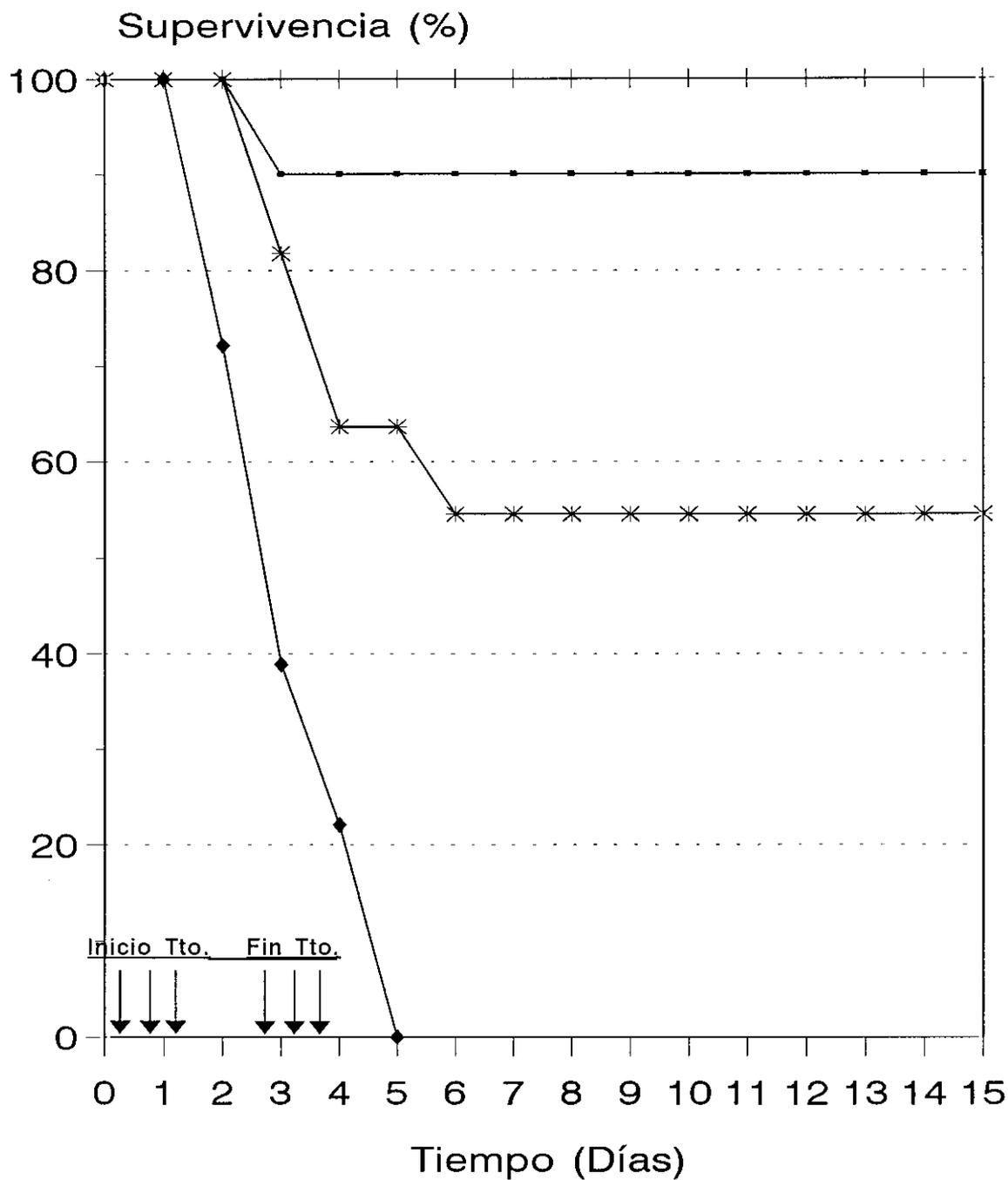
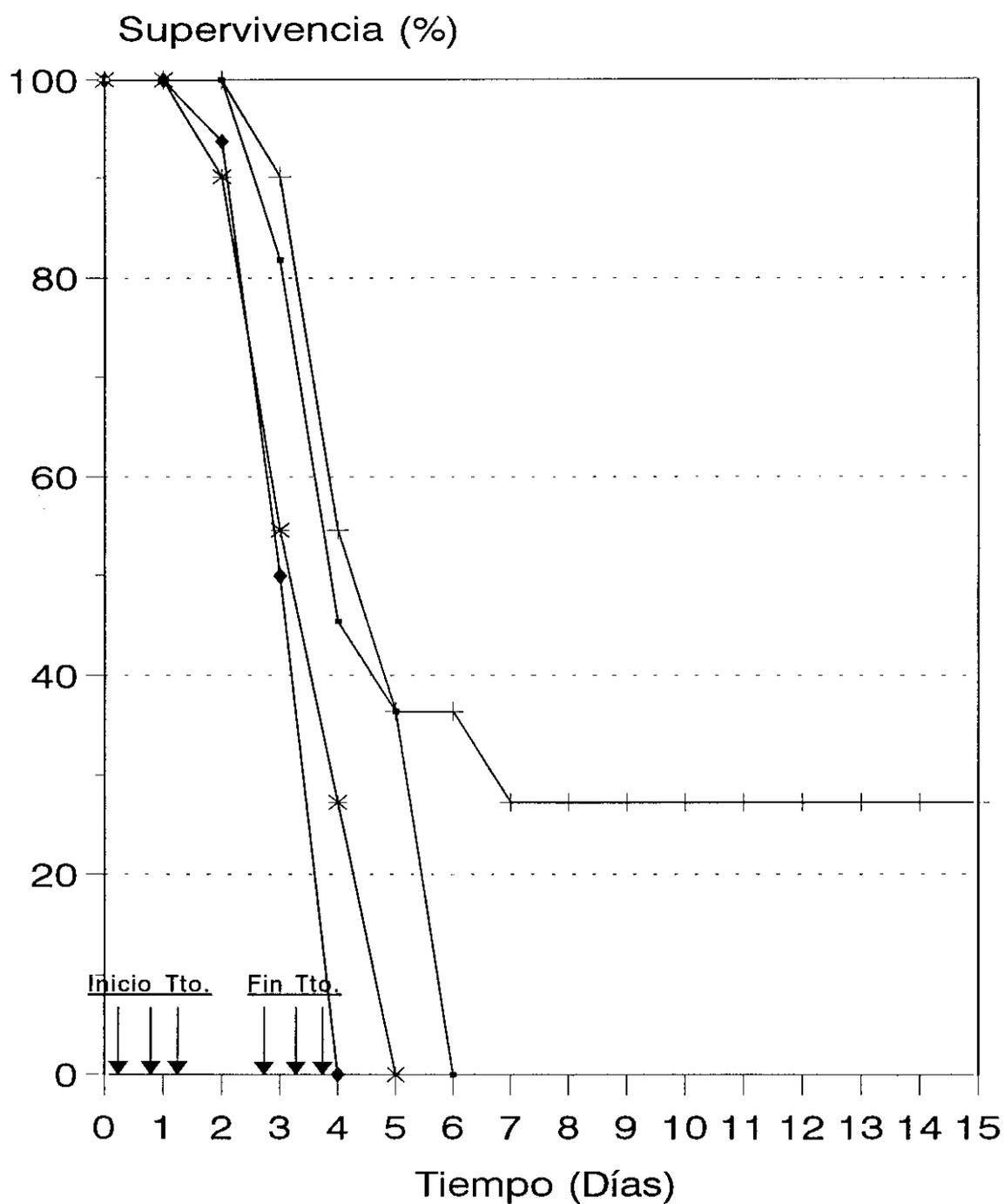


Figura 22. Efecto del tratamiento con amoxicilina/clavulánico en la supervivencia de animales infectados con *S. pneumoniae* serotipo 9.



◆ CONTROL + T 5 h - T 19 h * T 31 h

Figura 23. Efecto del inicio de tratamiento (horas p. i.) con (50/12.5) mg/kg de amoxicilina/clavulánico en animales infectados con *S. pneumoniae* serotipo 9.



◆ CONTROL + T 5 h × T 19 h * T 31 h

Figura 24. Efecto del tratamiento con 50 mg/kg de ciprofloxacino, iniciado a las 5, 19 y 31 horas p. i. en animales infectados con *S. pneumoniae* serotipo 9.

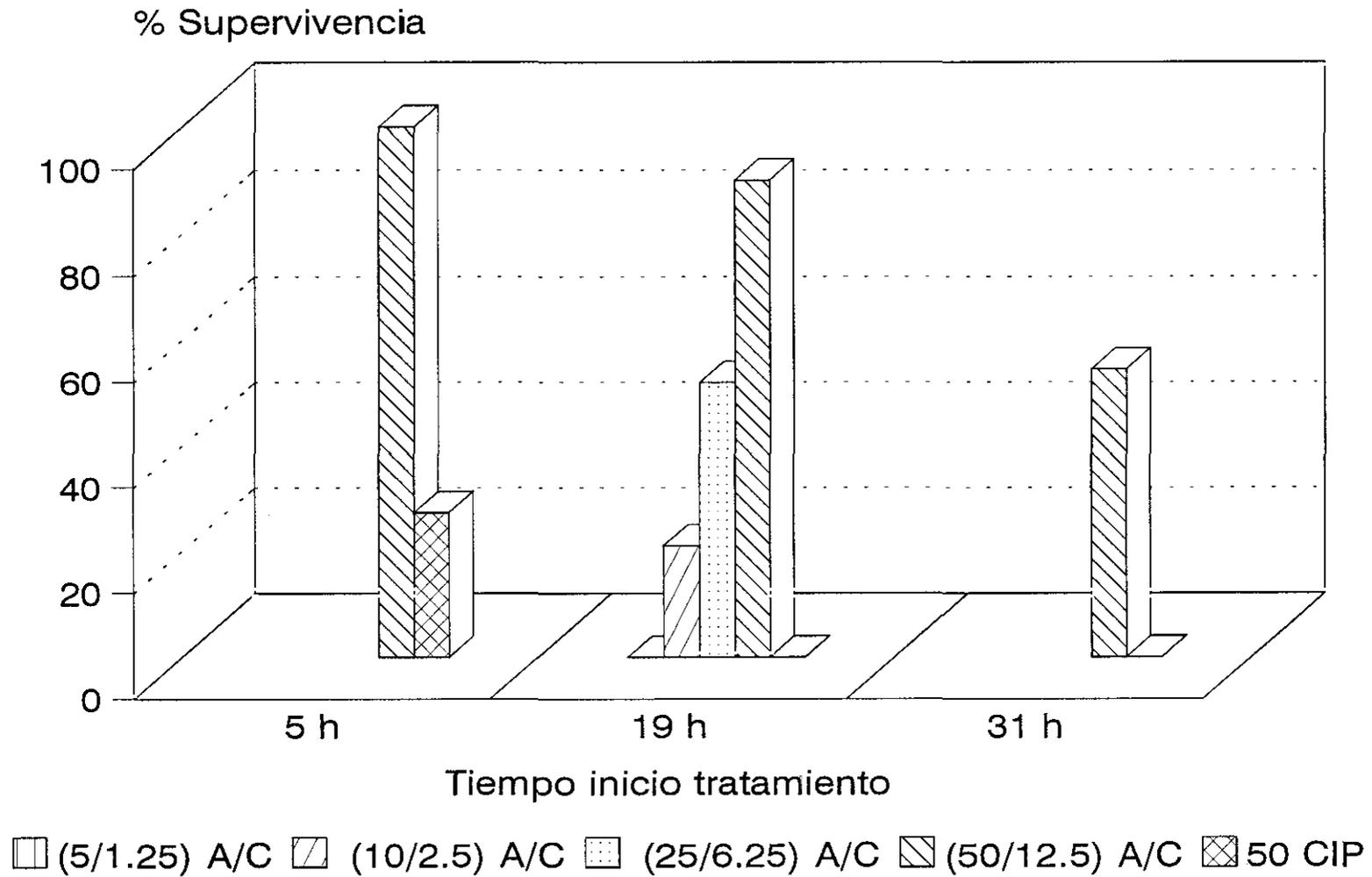


Figura 25. Efecto del tratamiento con amoxicilina/clavulánico (A/C) y ciprofloxacino (CIP) en la supervivencia final de animales infectados con *S. pneumoniae* serotipo 9.

INICIO TRATAMIENTO		5 h p.i.	19 h p.i.	31 h p.i.
AMOXICILINA/CLAVULANICO				
<i>S. pneumoniae</i> serotipo 3	Dosis	5 mg/kg	5 mg/kg	5 mg/kg
	% Superviv.	100	100	75
<i>S. pneumoniae</i> serotipo 6	Dosis	25 mg/kg	25 mg/kg	25 mg/kg
	% Superviv.	100	90.91	54.54
<i>S. pneumoniae</i> serotipo 9	Dosis	50 mg/kg	50 mg/kg	50 mg/kg
	% Superviv.	100	90.09	54.54
CIPROFLOXACINO				
<i>S. pneumoniae</i> serotipo 3	Dosis	50 mg/kg	50 mg/kg	50 mg/kg
	% Superviv.	0	0	0
<i>S. pneumoniae</i> serotipo 6	Dosis	50 mg/kg	50 mg/kg	50 mg/kg
	% Superviv.	81.81	54.54	18.18
<i>S. pneumoniae</i> serotipo 9	Dosis	50 mg/kg	50 mg/kg	50 mg/kg
	% Superviv.	27.27	0	0

Tabla 9.a. Porcentaje de supervivencia final para las diferentes cepas de *S. pneumoniae*, tras ser tratados con amoxicilina/clavulánico y ciprofloxacino en las dosis arriba indicadas.

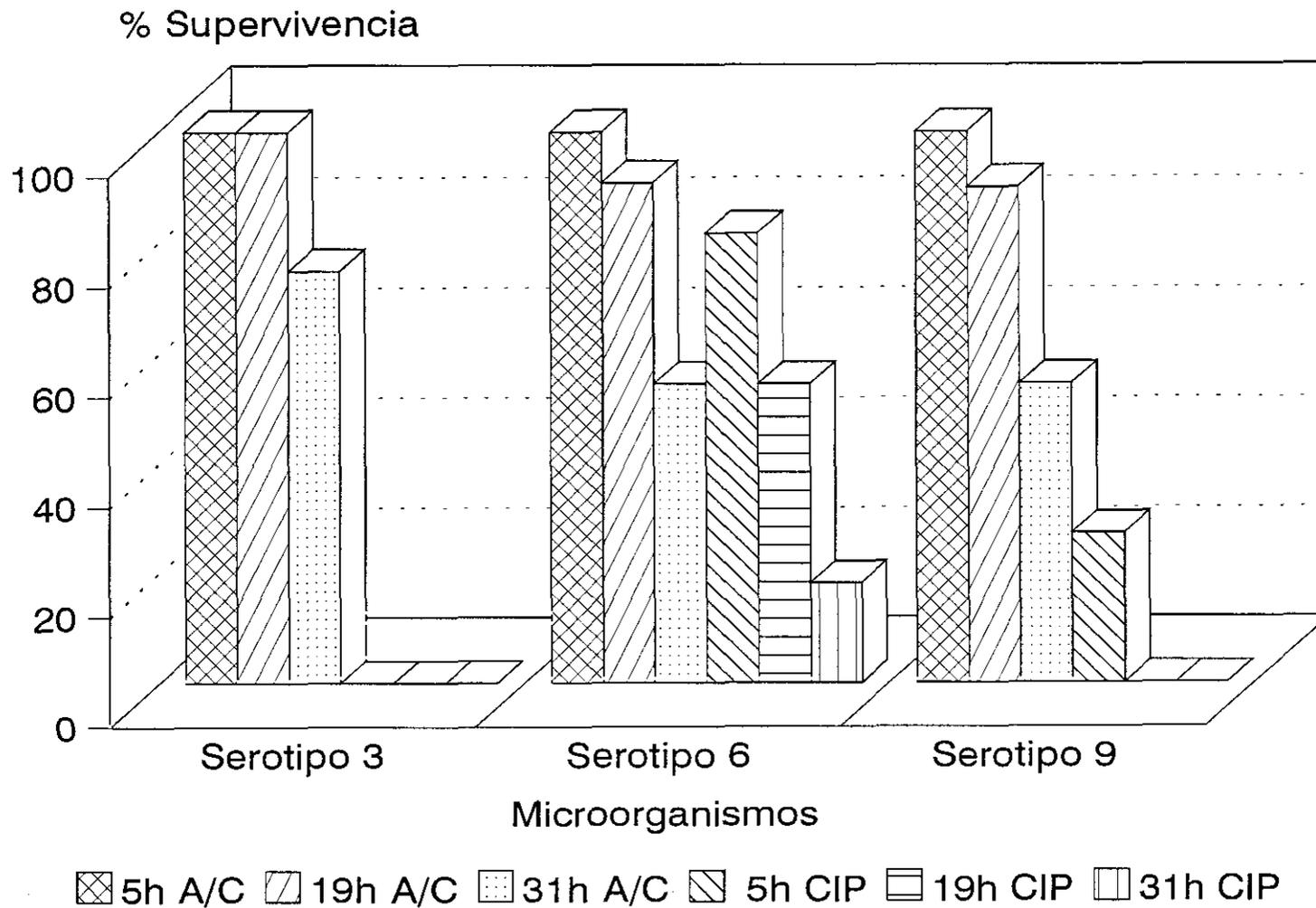


Figura 26. Porcentajes de supervivencia final para las diferentes cepas de *S. pneumoniae*, tras ser tratadas con amoxicilina/clavulánico (A/C) y ciprofloxacino (CIP) a las dosis reflejadas en la tabla 9.a y empezando el tratamiento a los tiempos arriba indicados.

Figura 27.a

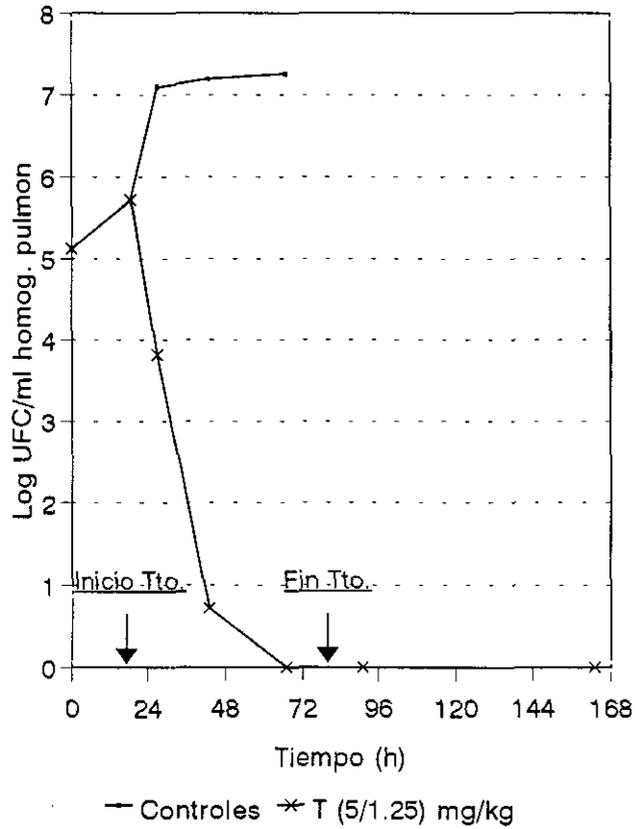


Figura 27.b

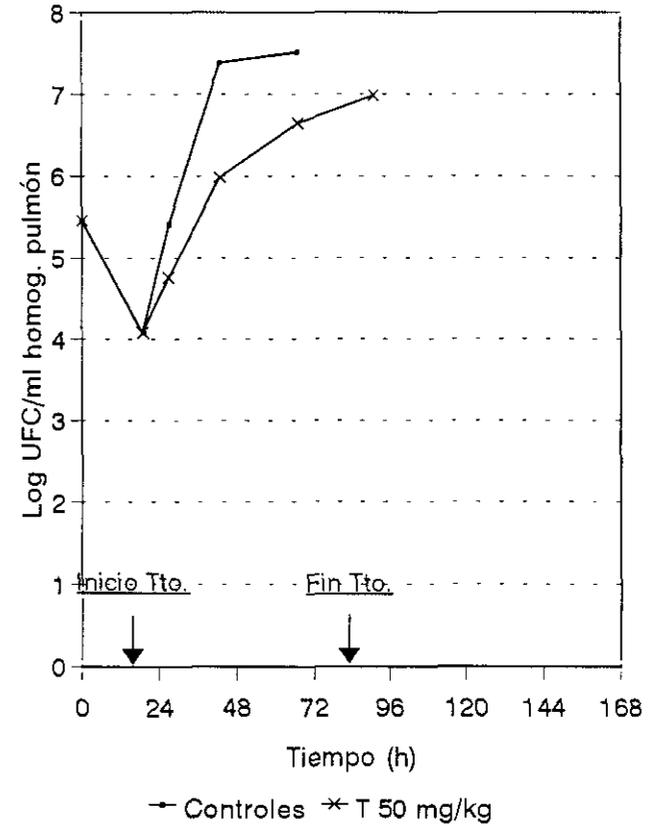


Figura 27. Curvas de letalidad *in vivo* de *S. pneumoniae* serotipo 3 tras la administración de (5:1.25) mg/kg de amoxicilina/clavulánico (Fig. 27.a) y de 50 mg/kg de ciprofloxacino (Fig. 27.b).

TIEMPO (h)	AMOXICILINA/CLAVULAN. (5:1.25) mg/kg		CIPROFLOXACINO 50 mg/kg	
	Controles	Tratados	Controles	Tratados
27 h (8 h 1 ^a Dosis)	1.38 ± 0.1 ^a	- 1.9 ± 0.81 ^b	1.33 ± 0.28	0.68 ± 0.74
43 h (12 h 2 ^a Dosis)	1.48 ± 0.79 ^a	- 5 ± 1.24 ^b	3.31 ± 0.27	1.91 ± 2
67 h (12 h 4 ^a Dosis)	1.54 ± 0.04 ^a	- 5.72 ± 0 ^b	3.44 ± 0.17	2.57 ± 0.42
91 h (12 h 6 ^a Dosis)		- 5.72 ± 0 ^b		2.91 ± 0.57
163 h (84 h 6 ^a Dosis)		- 5.72 ± 0		

Tabla 11. Cambios en la viabilidad ± DE de *S. pneumoniae* serotipo 3 a diferentes tiempos tras el tratamiento de los animales con amoxicilina/clavulánico (4:1) y ciprofloxacino.

^a Existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre controles y tratados.

^b Existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre el tratamiento con amoxicilina/clavulánico y ciprofloxacino.

Figura 28.a

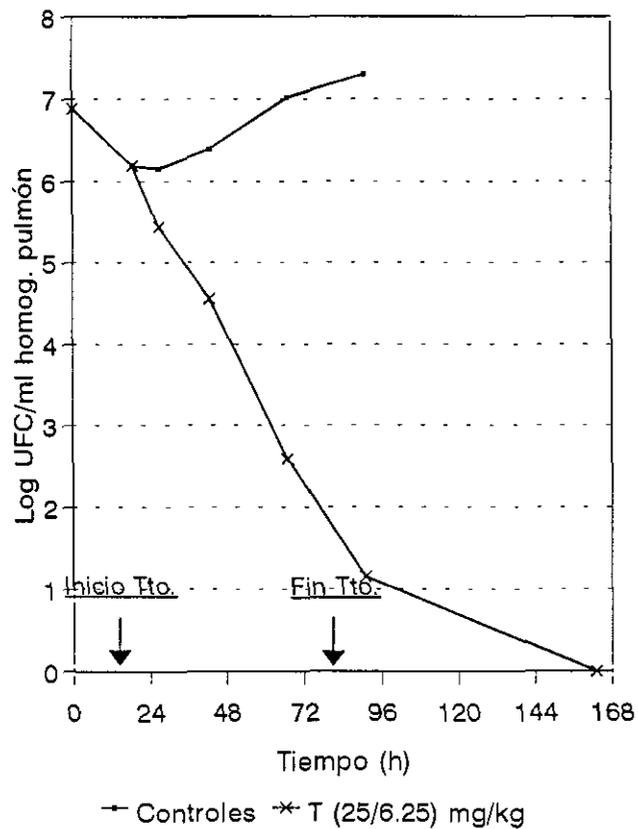


Figura 28.b

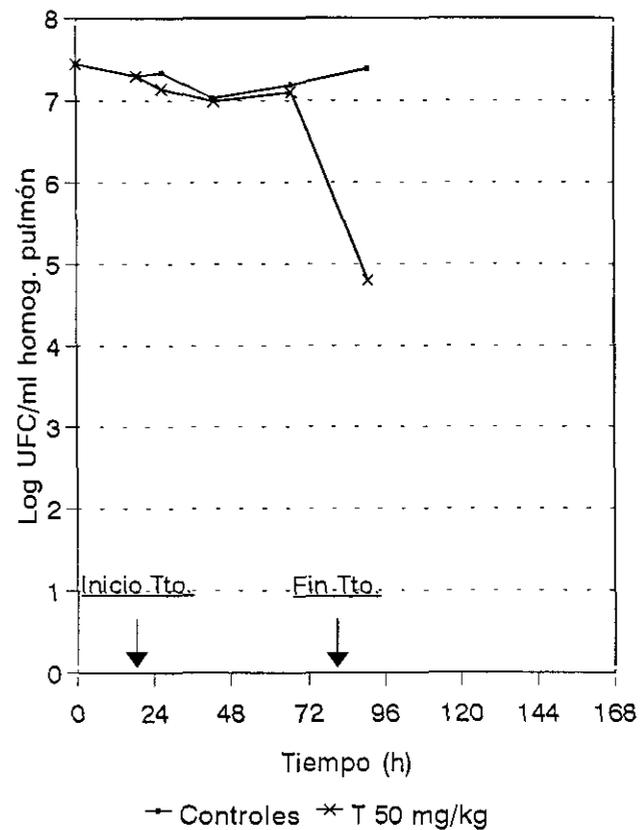


Figura 28. Curvas de letalidad *in vivo* de *S. pneumoniae* serotipo 6 tras la administración de (25:6.25) mg/kg de amoxicilina/clavulánico (Fig. 28.a) y de 50 mg/kg de ciprofloxacino (Fig. 28.b).

TIEMPO (h)	AMOXICILINA/CLAVULAN. (25:6.25) mg/kg		CIPROFLOXACINO 50 mg/kg	
	Controles	Tratados	Controles	Tratados
27 h (8 h 1ª Dosis)	- 0.04 ± 0.04 ^a	- 0.75 ± 0.02 ^b	0.04 ± 0.11	- 0.16 ± 0.17
43 h (12 h 2ª Dosis)	0.2 ± 0.01 ^a	- 1.63 ± 0.83	- 0.27 ± 0.14	- 0.31 ± 0.53
67 h (12 h 4ª Dosis)	0.83 ± 0.25 ^a	- 3.6 ± 0.32 ^b	- 0.11 ± 0.64	- 0.2 ± 0.37
91 h (12 h 6ª Dosis)	1.11 ± 0.01 ^a	- 5.04 ± 1.99 ^b	0.09 ± 0.01 ^a	- 2.5 ± 0.9
163 h (84 h 6ª Dosis)		- 6.19 ± 0		

Tabla 12. Cambios en la viabilidad ± DE de *S. pneumoniae* serotipo 6 a diferentes tiempos tras el tratamiento de los animales con amoxicilina/clavulánico (4:1) y ciprofloxacino.

^a Existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre controles y tratados.

^b Existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre el tratamiento con amoxicilina/clavulánico y ciprofloxacino.

Figura 29.a

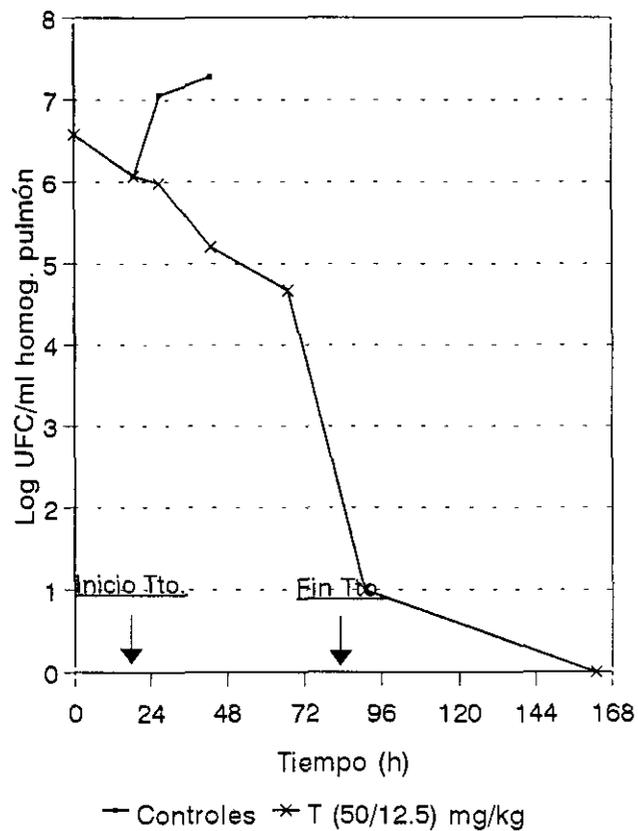


Figura 29.b

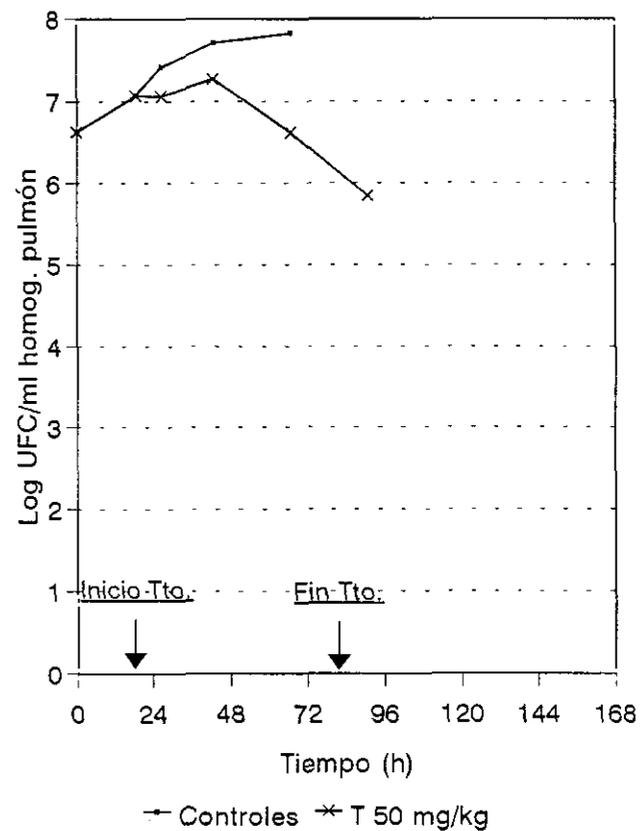


Figura 29. Curvas de letalidad *in vivo* de *S. pneumoniae* serotipo 9 tras la administración de (50:12.5) mg/kg de amoxicilina/clavulánico (Fig. 29.a) y de 50 mg/kg de ciprofloxacino (Fig. 29.b).

TIEMPO (h)	AMOXICILINA/CLAVULAN. (50:12.5) mg/kg		CIPROFLOXACINO 50 mg/kg	
	Controles	Tratados	Controles	Tratados
27 h (8 h 1ª Dosis)	0.99 ± 0.65	- 0.09 ± 0.52	0.35 ± 0.21	- 0.01 ± 0.53
43 h (12 h 2ª Dosis)	1.21 ± 0.11	- 0.87 ± 0.99	0.64 ± 0.08	0.2 ± 0.06
67 h (12 h 4ª Dosis)		- 1.4 ± 0.39	0.76 ± 1.03	- 0.45 ± 1.3
91 h (12 h 6ª Dosis)		- 5.08 ± 1.72 ^b		- 1.22 ± 0.01
163 h (84 h 6ª Dosis)		- 6.07 ± 0		

Tabla 13. Cambios en la viabilidad ± DE de *S. pneumoniae* serotipo 9 a diferentes tiempos tras el tratamiento de los animales con amoxicilina/clavulánico (4:1) y ciprofloxacino.

^a Existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre controles y tratados.

^b Existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre el tratamiento con amoxicilina/clavulánico y ciprofloxacino.

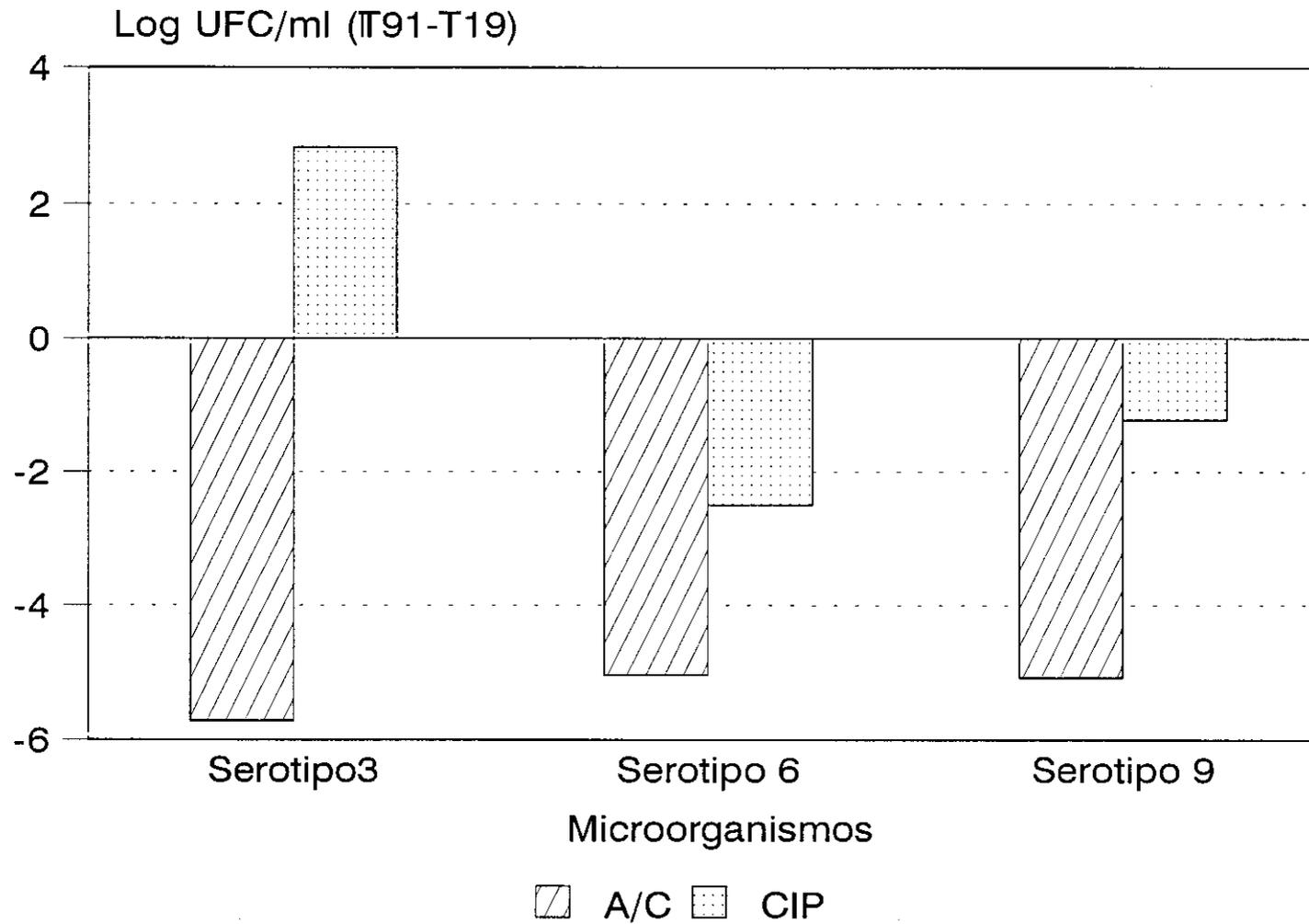


Figura 30. Cambios en la viabilidad de las tres cepas de *S. pneumoniae* a las 91 h p.i., 12 h tras la última administración de las DE₉₀ de amoxicilina/clavulánico (A/C) y de 50 mg/kg de ciprofloxacino (CIP).

TIEMPO (h)	AMOXICILINA/CLAVULAN. (5:1.25) mg/kg		CIPROFLOXACINO 50 mg/kg	
	Controles	Tratados	Controles	Tratados
19 h (To Tratam.)	3/3	3/3	3/3	3/3
27 h (8 h 1ª Dosis)	3/3	2/3	3/3	3/3
43 h (12 h 2ª Dosis)	3/3	0/3	3/3	3/3
67 h (12 h 4ª Dosis)	3/3	0/3	3/3	3/3
91 h (12 h 6ª Dosis)		0/3		3/3
163 h (84 h 6ª Dosis)		0/3		

Tabla 14. Número de animales con presencia de *S. pneumoniae* serotipo 3 en sangre (cultivo positivo) respecto del total de animales, a diferentes tiempos tras el tratamiento con amoxicilina/clavulánico (4:1) y ciprofloxacino.

TIEMPO (h)	AMOXICILINA/CLAVULAN. (25:6.25) mg/kg		CIPROFLOXACINO 50 mg/kg	
	Controles	Tratados	Controles	Tratados
19 h (To Tratam.)	2/3	2/3	2/3	2/3
27 h (8 h 1ª Dosis)	2/3	1/3	3/3	3/3
43 h (12 h 2ª Dosis)	3/3	1/3	3/3	3/3
67 h (12 h 4ª Dosis)	3/3	0/3	3/3	3/3
91 h (12 h 6ª Dosis)	3/3	0/3		2/3
163 h (84 h 6ª Dosis)		0/3		

Tabla 15. Número de animales con presencia de *S. pneumoniae* serotipo 6 en sangre (cultivo positivo) respecto del total de animales, a diferentes tiempos tras el tratamiento con amoxicilina/clavulánico (4:1) y ciprofloxacino.

TIEMPO (h)	AMOXICILINA/CLAVULAN. (50:12.5) mg/kg		CIPROFLOXACINO 50 mg/kg	
	Controles	Tratados	Controles	Tratados
19 h (To Tratam.)	3/3	3/3	3/3	3/3
27 h (8 h 1ª Dosis)	3/3	3/3	3/3	3/3
43 h (12 h 2ª Dosis)	3/3	3/3	3/3	3/3
67 h (12 h 4ª Dosis)		2/3	3/3	3/3
91 h (12 h 6ª Dosis)		0/3		2/3
163 h (84 h 6ª Dosis)		0/3		

Tabla 16. Número de animales con presencia de *S. pneumoniae* serotipo 9 en sangre (cultivo positivo) respecto del total de animales, a diferentes tiempos tras el tratamiento con amoxicilina/clavulánico (4:1) y ciprofloxacino.

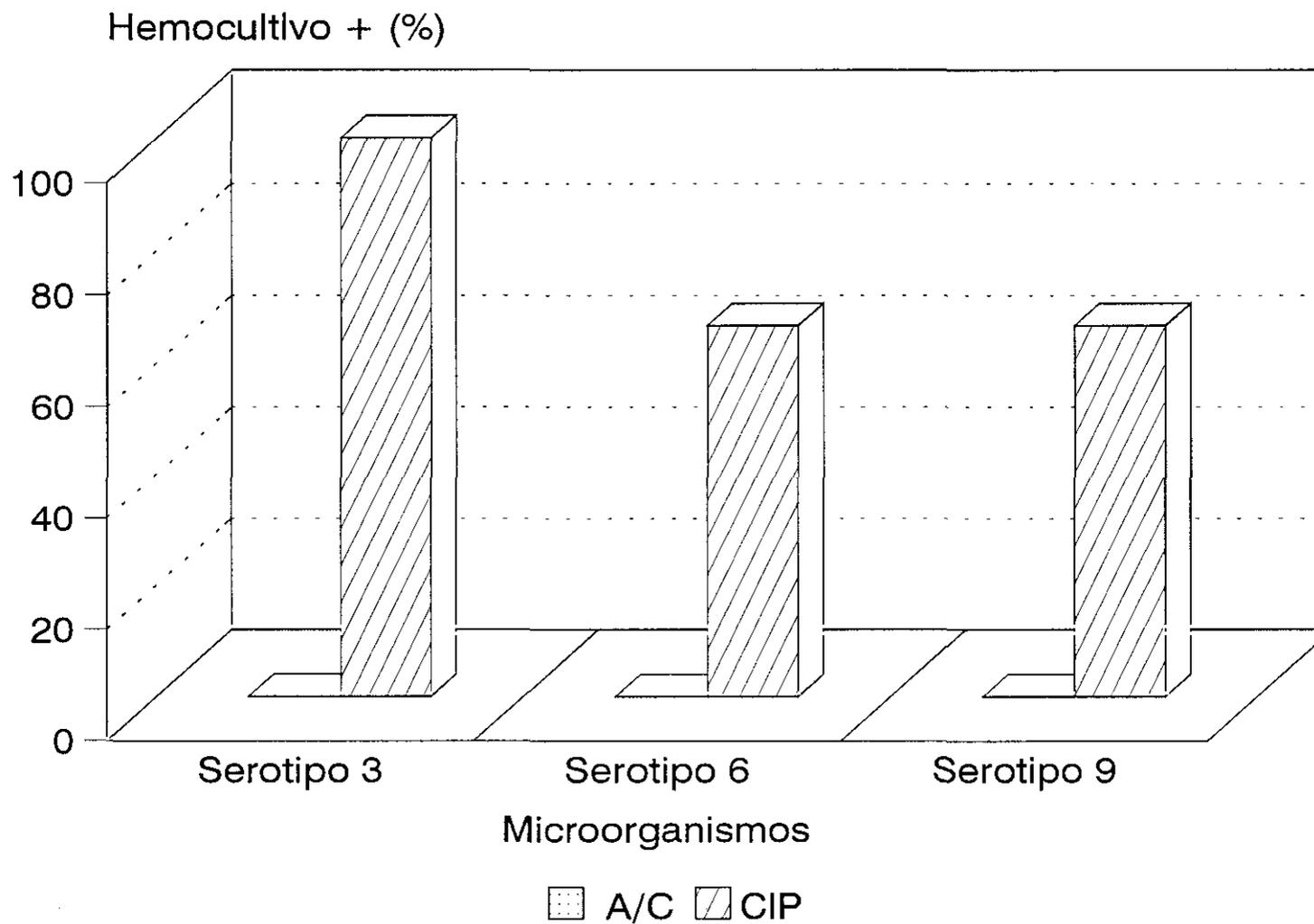


Figura 31. Hemocultivos positivos (en %) a las 91 h p.i. en animales infectados con *S. pneumoniae* de los serotipos 3, 6 y 9, y tratados con la DE₉₀ de amoxicilina/clavulánico (A/C) y con 50 mg/kg de ciprofloxacino (CIP).

Figura 32.a

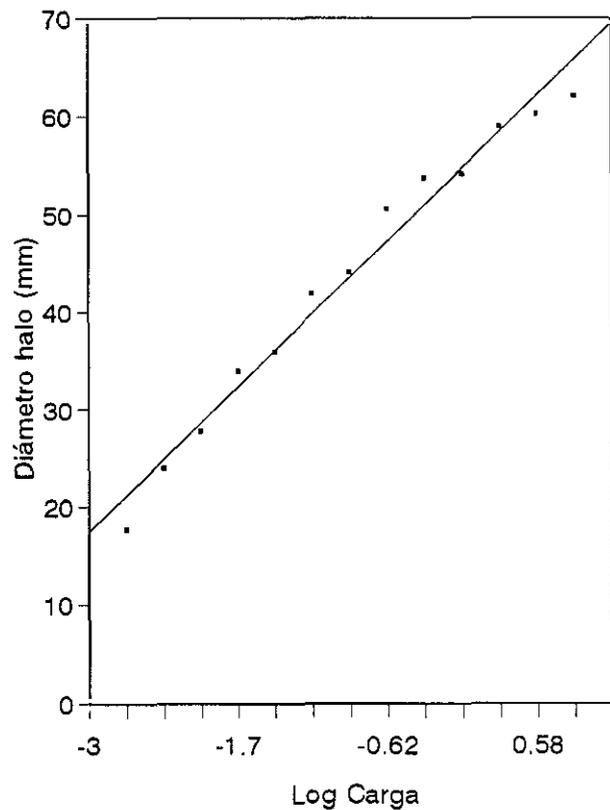


Figura 32.b

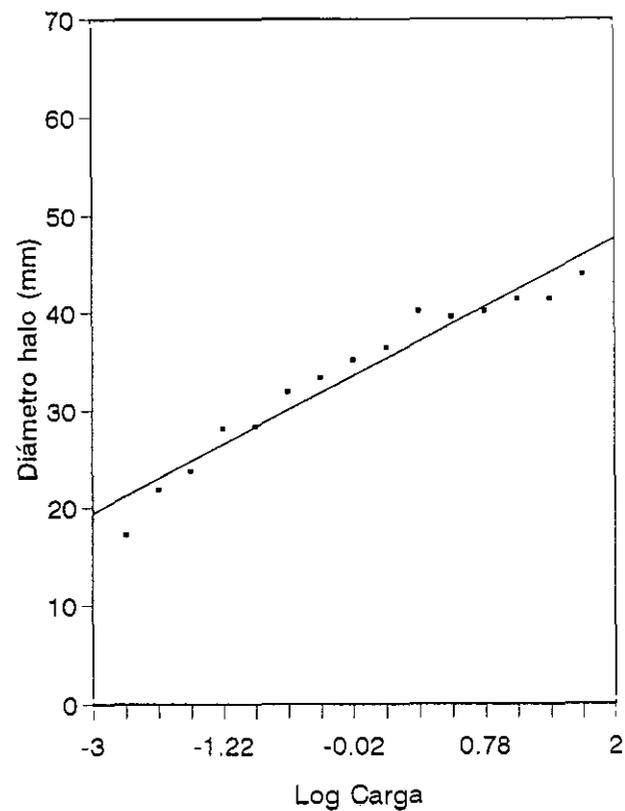


Figura 32. Rectas patrón del diámetro del halo de inhibición frente al logaritmo de la carga de amoxicilina (Fig. 32.a) y ciprofloxacino (Fig. 32.b) frente a *M.luteus* ATCC 9341 y *E. coli* ATCC 25922 respectivamente.

Figura 33.a

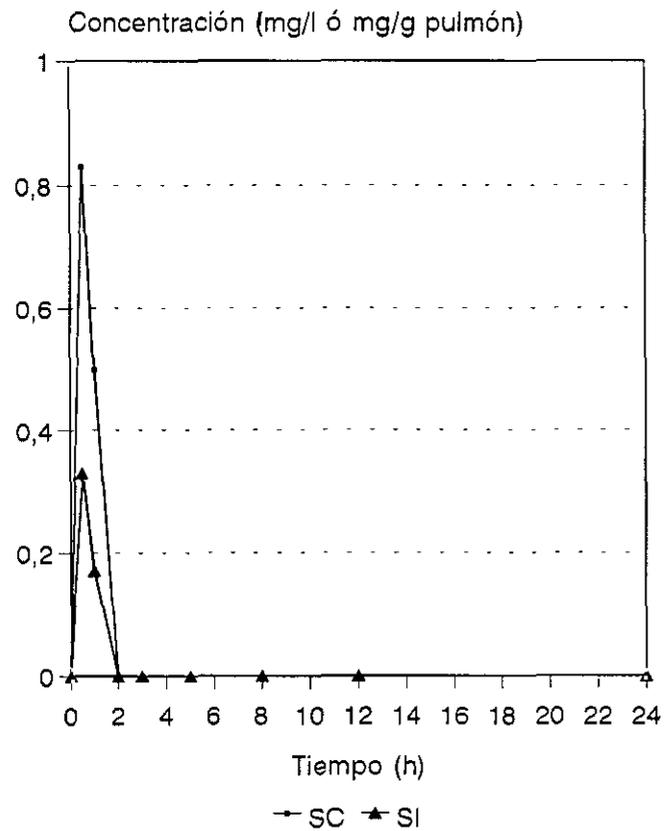


Figura 33.b

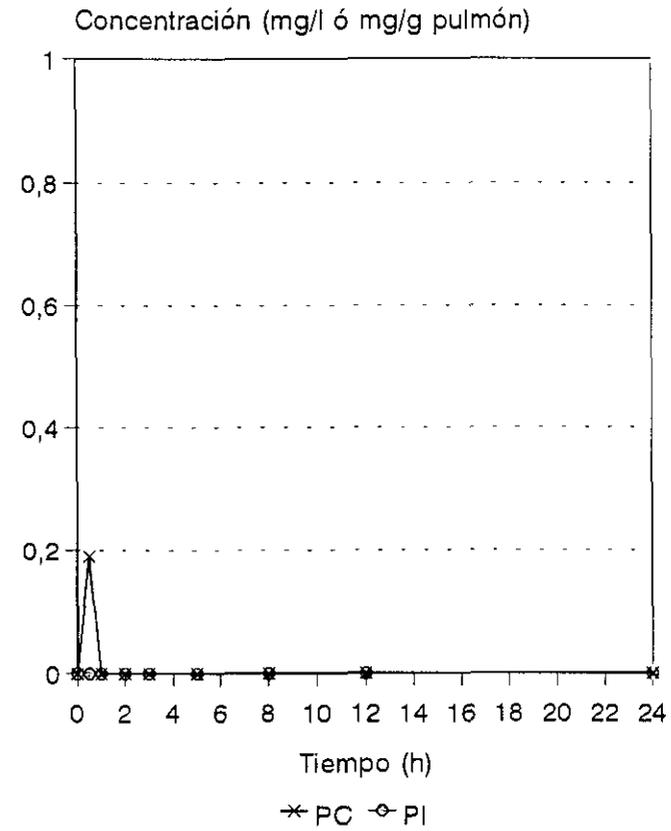


Figura 33. Concentración de amoxicilina en suero (S) y pulmón (P) de ratón sin infectar (C) e infectado (I), tras la administración de una dosis de 5 mg/kg.

Figura 34.a

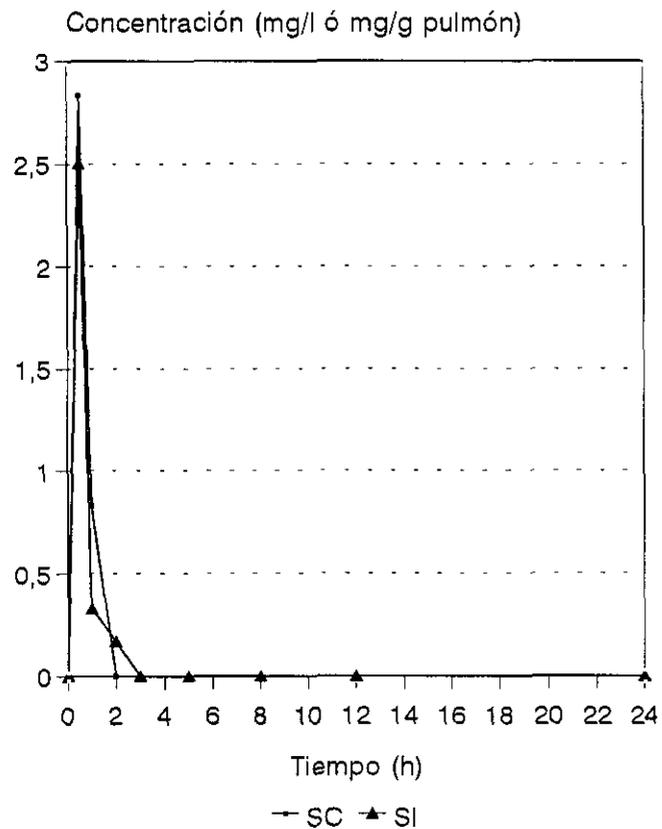


Figura 34.b

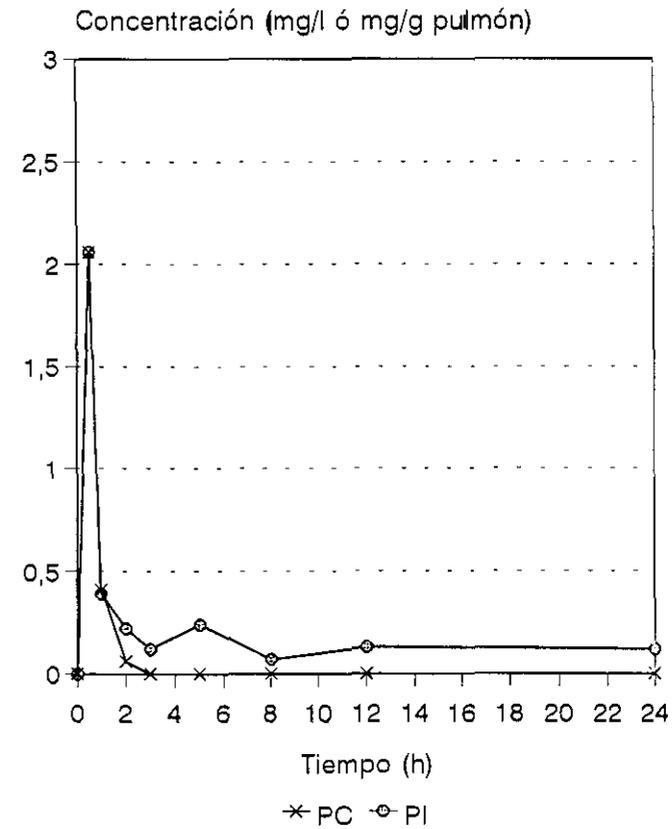


Figura 34. Concentración de amoxicilina en suero (S) y pulmón (P) de ratón sin infectar (C) e infectado (I), tras la administración de una dosis de 25 mg/kg.

Figura 35.a

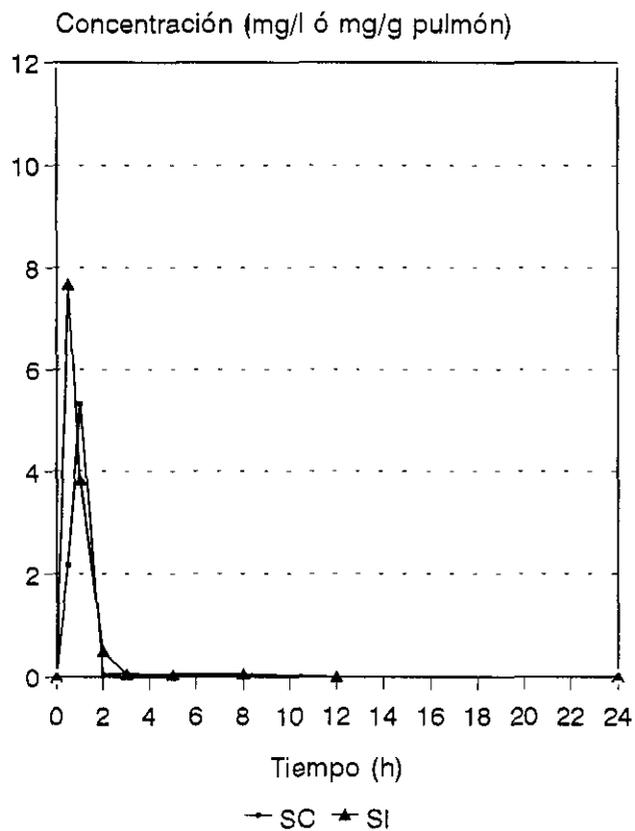


Figura 35.b

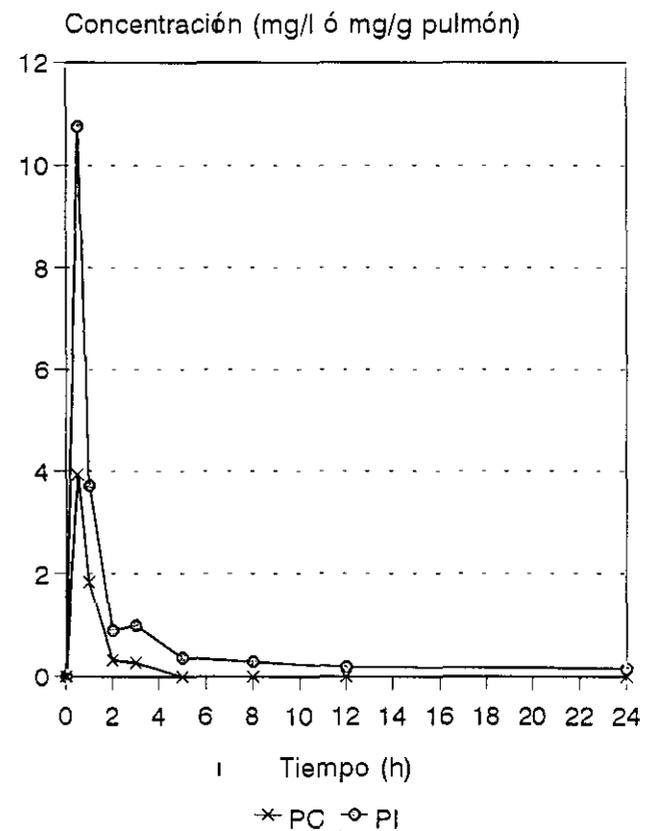


Figura 35. Concentración de amoxicilina en suero (S) y pulmón (P) de ratón sin infectar (C) e infectado (I) tras la administración de una dosis de 50 mg/kg.

Figura 36.a

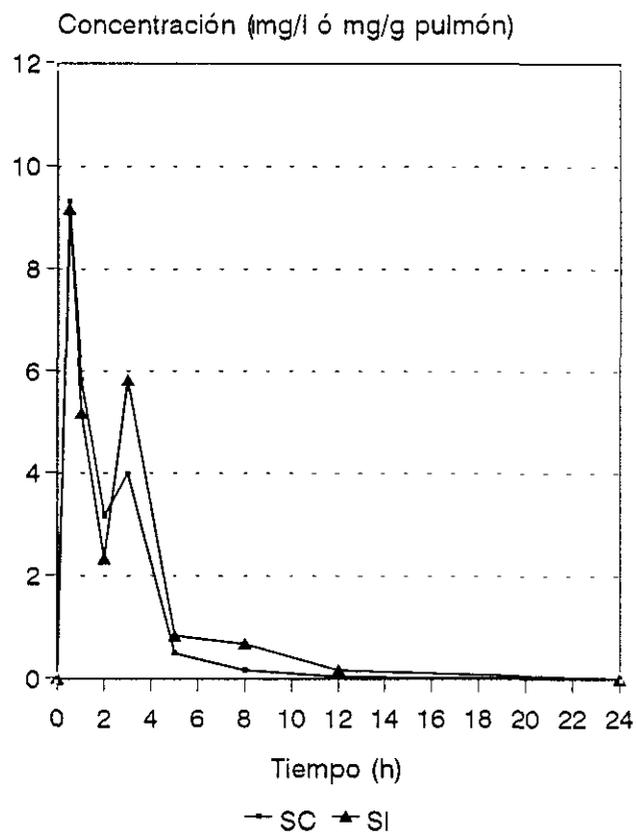


Figura 36.b

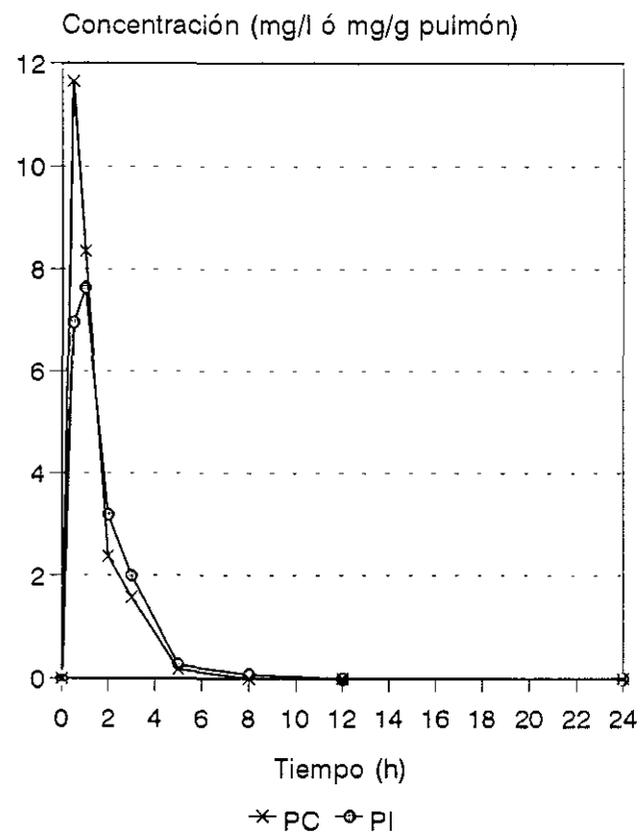


Figura 36. Concentración de ciprofloxacino en suero (S) y pulmón (P) de ratón sin infectar (C) e infectado (I) tras la administración de una dosis de 50 mg/kg.

Antimicrob.	Dosis (mg/kg)	Localización	C máx (mg/l) ó (mg/g)	T máx (h)	T _{1/2} (h)	T > CMI (h)			ABC (mg h/l) ó (mg h/g)
						Ser. 3	Ser. 6	Ser. 9	
Amoxicilina	5	SC	0.83	0.5	1.16	1.99	1.33	0	0.83
		SI	0.33	0.5	1	1.99	0.4	0	0.31
		PC	0.19	0.5	0.83	0.29	0	0	0.1
		PI	-	-	-	0	0	0	0
Amoxicilina	25	SC	2.83	0.5	0.93	1.99	1.66	0.33	2.15
		SI	2.5	0.5	0.66	2.99	1.33	0.33	1.42
		PC	2.06	0.5	0.8	2.99	1.36	0.01	1.26
		PI	2.06	0.5	0.8	24	1.93	0.01	4.16
Amoxicilina	50	SC	5.33	1	1.43	4.99	1.83	1.23	5.36
		SI	7.67	0.5	1	8	2.66	1.5	6.53
		PC	3.94	0.5	1.03	4.99	3.02	0.66	3.58
		PI	10.76	0.5	0.86	24	8.11	1.67	14.06
Ciprofloxac.	50	SC	9.33	0.5	1.33	4.6	4.6	5	16.32
		SI	9.17	0.5	1.1	4.83	4.83	9.33	22.34
		PC	2.33	0.5	1.33	3.67	3.67	4.5	18.6
		PI	1.83	1	1.9	4.17	4.17	4.73	15.3

Tabla 17. Valores de diversos parámetros farmacocinéticos obtenidos tras distintas dosificaciones de amoxicilina y ciprofloxacino.

VI. DISCUSSION

Con objeto de hacer una valoración y discusión de los resultados obtenidos en este trabajo, se hará un análisis pormenorizado de cada uno de los fenómenos estudiados, de la metodología utilizada y de los resultados obtenidos.

1. ELECCION DE LAS CEPAS BACTERIANAS Y ANTIMICROBIANOS

Un aspecto importante a la hora de la elección de un tratamiento antibiótico es conocer cual es la situación de las resistencias de los microorganismos más frecuentemente implicados como causa de neumonía en la comunidad, fundamentalmente, *S. pneumoniae*, ya que normalmente el tratamiento se va a instaurar de forma empírica y la mayor parte de las veces sin un cultivo adecuado que nos pueda informar de la sensibilidad del germen. Nuestro país, junto con Hungría, han sido focos de atención de las resistencias de los neumococos a la penicilina aunque ya se han empezado a encontrar tasas de resistencias en otros países europeos y en EEUU, aunque sin llegar a nuestras cifras de resistencia. En España la resistencia del neumococo a la penicilina ha evolucionado desde un 4.3-6% en 1979 hasta un 18-26% en 1992, pasándose en lo referente a cepas con alto nivel de resistencia de un 0% en 1979 a 8.3-14.9% en 1992 (173), aumentando desde este año estas cifras en muchos hospitales. Respecto a la resistencia del neumococo a los macrólidos desde 1979 a 1992 se ha pasado de un 1% a un 12% en datos del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias de Majadahonda, cifras similares a las de otros hospitales de la geografía española, aunque hay hospitales como el Gregorio Marañón de Madrid que arrojan cifras más elevadas, de casi el 20%, cercanas a las encontradas en Francia. Las resistencias a las tetraciclinas se sitúan actualmente entre un 20 a un 40%, siendo la resistencia al cotrimoxazol superior al 40%, lo cual desaconseja en la actualidad el uso de estos dos antibióticos en nuestro país ante una sospecha de infección neumocócica. En cuanto a las cefalosporina, cefotaxima y ceftriaxona son las que exhiben mejor sensibilidad frente a los neumococos resistentes, siendo cefuroxima axetil, cefdinir y cefpodoxima las cefalosporinas orales que pesentan mejor CMI para los neumococos resistentes a penicilina (174), aunque con CMI más elevadas que cefotaxima y/o ceftriaxona, debiendo destacarse que la totalidad de los neumococos aislados en el país son sensibles a vancomicina.

No obstante, aunque la trascendencia de la resistencia del neumococo está fuera de toda duda en los pacientes con meningitis, no se puede decir lo mismo en las infecciones

respiratorias, en particular en aquellas con resistencia intermedia a penicilina, que posiblemente pueden continuar tratándose con un aumento de la dosis de betalactámicos.

Ante esta situación, se eligieron para la realización de este estudio tres aislados clínicos de *S. pneumoniae* de diferente sensibilidad a penicilina: una cepa sensible, otra de resistencia intermedia o parcialmente resistente y otra de alta resistencia. El concepto microbiológico de resistencia de *S. pneumoniae* a penicilina está relacionado con el concepto clínico de fallo terapéutico en meningitis, situándose alrededor de 0.8 µg/ml la concentración máxima en líquido cefalorraquídeo tras dosis elevadas de penicilina por vía endovenosa (175). Por ello se definen como cepas de *S. pneumoniae* sensibles a penicilina aquellas con CMI ≤ 0.06 µg/ml, parcialmente resistentes con CMI entre 0.1 y 1 µg/ml y altamente resistentes con CMI ≥ 2µg/ml.

Los tres países en los que se ha detectado una mayor incidencia de cepas de neumococo resistentes a penicilina son Suráfrica, España y Hungría. En Suráfrica los aislados pertenecen predominantemente a los serotipos 6, 14, 19 y 23 (176). En España entre las cepas resistentes, los serotipos 6, 9, 19 y 23 son los más comunmente aislados en hemocultivos, los serotipos 6, 9 y 23 en LCR, y los serotipos 6, 9, 14, 19 y 23 en los pulmones (177). Por último, en Hungría los aislados resistentes pertenecen principalmente a los serotipos 19A, 6B, y 23F (178). Ante esto nosotros escogimos cepas resistentes pertenecientes a los serotipos 6 y 9. La cepa sensible pertenece al serotipo 3, ya que este es el serotipo más comunmente aislado entre las cepas sensibles (179).

En cuanto a la elección del antimicrobiano, se escogió un betalactámico combinado con un inhibidor de betalactamasas, amoxicilina/clavulánico y una quinolona, ciprofloxacino. Amoxicilina fue elegida para comprobar si todavía puede ser un tratamiento de elección antineumocócico. El elegirla en combinación con el ácido clavulánico se debe a que, aunque el mecanismo de resistencia del neumococo a los betalactámicos no es por producción de betalactamasas, al ser el tratamiento empírico en la práctica se elige amoxicilina/clavulánico para cubrir la posibilidad de que la infección se deba a otros patógenos como *H. influenzae*, que sí es productor de betalactamasas.

El otro antimicrobiano elegido fue ciprofloxacino. Esta elección se debe a las expectativas que existen en torno a la posibilidad de utilizar las quinolonas en el tratamiento de infecciones respiratorias.

2. ANALISIS DEL METODO EXPERIMENTAL

2.1. ANALISIS DEL METODO EXPERIMENTAL *IN VITRO*

Los test *in vitro* son indicadores aproximados de la situación real de un proceso infeccioso, pero los resultados que obtenemos son esenciales para comprender el fenómeno a estudiar y establecer, posteriormente, modelos animales y estudios en humanos. Por ello, la selección del método más apropiado nos beneficiará con la obtención de unos resultados claros, fiables y fáciles de extrapolar a la situación *in vivo*.

Los ensayos *in vitro* realizados en este trabajo son las curvas de letalidad y el efecto postantibiótico, por lo que a continuación se hace un estudio pormenorizado de cada uno de los factores que más directamente pueden influir en su realización, centrándose principalmente en el efecto postantibiótico.

2.1.1. Curvas de letalidad

La determinación de la actividad bactericida de los antibióticos, definida convencionalmente como aquella que consigue el 99.9% de letalidad del inóculo inicial después de 24 horas de incubación, puede estar influida por factores metodológicos, por las características biológicas del microorganismo, por la fase de crecimiento, por la posible degradación de los antimicrobianos a las 24 horas, etc. En el caso de *S. pneumoniae*, a estos factores hay que añadir la rápida autólisis de este microorganismo a las 24 horas.

Así, el estudio mediante curvas de letalidad constituye una buena técnica para conocer la dinámica de la actividad bactericida en función del tiempo y de la concentración del antimicrobiano. Aún así, existen algunos factores que pueden influir en los resultados obtenidos al realizar curvas de letalidad, y que básicamente también son los mismos que afectan a la realización del EPA, por lo que se hablará de ellos en el siguiente punto.

2.2.2. Efecto postantibiótico (EPA)

Existen muchos factores como el tipo de medio utilizado, el pH del mismo, la concentración del inóculo inicial, la concentración de antimicrobiano, etc. que pueden influir

en la duración del EPA. Se hará un estudio de cada uno de ellos, explicando las condiciones en las que ha realizado este estudio y por qué se han elegido.

2.2.2.1. Influencia del medio de cultivo

Los medios de cultivo constituyen un factor importante en la existencia y/o duración del EPA. Así todos aquellos componentes que produzcan un cambio en el pH, en la concentración de cationes, sales minerales o proteínas afectarán a la actividad bactericida de los antimicrobianos y por tanto al EPA (180).

Los cambios en la presión osmótica de los medios nutritivos van a condicionar que las bacterias tratadas sean más fácilmente lisadas en medios hiper/hipotónicos y ello puede alterar el EPA. Así, los esferoplastos que elaboran su pared antes de dividirse mueren si la presión osmótica es inadecuada y por tanto su EPA puede ser sobreestimado, mientras que las bacterias viables que tienen su pared intacta pueden dividirse antes y por tanto su EPA ser más corto.

No muchos autores han investigado la influencia del tipo de medio usado (181, 182, 183), o la presencia en esos medios de suero (184, 185), orina (186), o líquido cefaloraquídeo (187), considerando que deberían realizarse estudios más extensos sobre este aspecto.

En este trabajo se escogió el caldo Todd-Hewitt por ser un medio que tiene elementos nutritivos adecuados para permitir el crecimiento de *S. pneumoniae*, microorganismo delicado en este aspecto. Se prefirió el uso de este medio al del tradicional caldo Müeller-Hinton suplementado con sangre desfibrinada de carnero o caballo al 5%, porque la presencia de sangre por una parte impedía el poder ajustar los inóculos iniciales mediante espectrofotometría y por otra parte interfería también en el método de centrifugación y posterior dilución elegido para eliminar el antibiótico.

2.2.2.2. Influencia del pH del medio

La actividad bactericida y el EPA de los antibióticos se encuentran estrechamente relacionadas y muchos de los factores que modifican o alteran la actividad antibacteriana

modifican también la existencia y la duración del EPA. El pH es una de las variables que más influye en la actividad de los antimicrobianos y que va a repercutir también en el EPA (180). La influencia del pH se debe probablemente a los distintos grados de ionización de los antimicrobianos en el medio ambiente celular, lo cual afectaría a su penetración y fijación en la célula bacteriana.

En este estudio se eligió un pH fisiológico de 7.2 ± 0.2 para todos los ensayos por la posibilidad de comparar con otros autores. Sin embargo casi todos los estudios de EPA se realizan a pH fisiológico si considerar que en la mayoría de los procesos infecciosos el pH es más ácido y que, por ejemplo, ello reducirá la actividad bactericida de aminoglucósidos y fluorquinolonas (186, 188, 189), aumentando los valores de sus CMIs, mientras que los betalactámicos se ven menos afectados (180).

2.2.2.3. Influencia de la agitación mecánica

Hay estudios contradictorios acerca de si los cultivos estacionarios o en agitación presentan un EPA distinto (190, 191), y la mayoría de los investigadores no informan sobre la utilización o no de agitación mecánica de los cultivos.

En este estudio los ensayos se hicieron en agitación continua, y creemos que deberían realizarse estudios más extensos sobre este aspecto del EPA.

2.2.2.4. Influencia de la concentración del inóculo inicial

Una de las variables más importantes en el estudio de la actividad de un antibiótico es la concentración del inóculo, que para la CMI/CMB se trata de estandarizar en 10^5 UFC/ml (158). Sin embargo, este apunte de estandarización es inexistente en el EPA, y así, el rango del inóculo varía según los autores (160, 192, 193).

La influencia de la concentración del inóculo en la actividad bactericida de un antimicrobiano va a depender por un lado del antibiótico (características fisico-químicas, mecanismo de acción, farmacocinética, etc) y por otro de la bacteria a la que se enfrenta (tipo y cepa, fase de crecimiento y tiempo de generación de la misma).

Por efecto inóculo se entiende la existencia de una cooperación bacteriana que con frecuencia limita la acción del antibiótico. De esta manera, la actividad letal de un antimicrobiano es inversamente proporcional a la densidad de la población bacteriana. Se ha descrito con penicilinas, cefalosporinas de 1ª, 2ª y 3ª generación, imipenem y monobactam para bacilos gram negativos y para *S. aureus* (194, 195, 196), y es posible que tenga trascendencia *in vivo*, incluso con mayor frecuencia de lo que hasta ahora se conoce.

En este estudio se partió de inóculos de 10^6 - 10^7 UFC/ml tanto para la realización de las curvas de letalidad como para el EPA.

2.2.2.5. Influencia de la fase de crecimiento de los microorganismos

Las propiedades que caracterizan al inóculo con que iniciamos el ensayo van a condicionar el desarrollo del mismo y, aunque es un factor crítico (197), no se ha evaluado suficientemente su papel.

Existe controversia en la duración del EPA según se realice en una u otra fase de crecimiento bacteriano, y así, mientras Craig y Gudmundsson (160) con penicilina G y *S. aureus* o Gerber (198) con gentamicina y *P. aeruginosa* no han encontrado diferencias significativas entre el EPA detectado con las bacterias en fase logarítmica y el calculado con las bacterias en fase estacionaria. Otros autores (192, 199, 200), al contrario, si han podido detectar esas diferencias y encuentran EPA más prolongado en fase exponencial que en fase estacionaria. Tuomanen (201), observó un inmediato recrecimiento de *S. pneumoniae* tras la eliminación de penicilina G, cuando la exposición al antibiótico se realizaba en fase estacionaria de crecimiento.

En este estudio se inició el protocolo experimental a partir de un cultivo en fase estacionaria que se diluía en medio fresco para comenzar el ensayo, tanto para la realización de las curvas de letalidad como para el EPA. Utilizamos microorganismos en esta fase de crecimiento, ya que esta situación refleja más fielmente lo que ocurre “*in vivo*” (202).

2.2.2.6. Influencia de la concentración de antimicrobiano

Eagle (203) fue el primer investigador que examinó el efecto de la concentración del antimicrobiano sobre el EPA. Sus estudios con penicilina G sobre cocos gram positivos demostraron que la duración del EPA aumentaba con incrementos de las concentraciones hasta un tiempo máximo de EPA a la concentración de penicilina más rápidamente bactericida para el microorganismo, e incrementos en la concentración de incluso 10.000 veces sobre ese nivel no prolongaban significativamente la duración del EPA.

Asimismo, la mayoría de los autores (162, 182, 192, 204, 205) sólo encuentran EPA cuando ensayan a concentraciones mayores o iguales a la CMI, y observan que incrementos en la concentración prolongan el EPA a un punto de máxima respuesta por encima del cual no se observa un aumento significativo del EPA, que para la mayoría de las combinaciones de antibiótico/microorganismo que realmente tienen EPA, se halla a 6-10 CMI (192, 182).

Existen numerosos estudios sobre el EPA en los que se utilizan valores muy variados de concentración de antimicrobiano, lo que hace difícil la comparación ya que esta es una de las variables que más influencia tiene en los resultados. Para este propósito, la concentración de antimicrobiano debería estar también estandarizada.

En general, deberían escogerse aquellas concentraciones que se alcanzan realmente en suero, tejidos o líquidos orgánicos después de una dosis habitual de antibiótico, y así aproximar más fácilmente los resultados *in vitro* a la situación *in vivo*. En este estudio se eligieron las concentraciones de 1, 4 y 10 CMI, tanto para la realización de las curvas de letalidad como para el EPA, con la idea de ver lo que ocurría a nivel de la CMI, a concentraciones de 4 CMI ya que alrededor de 4-5 CMI es la concentración que se alcanza en suero tras la administración de una dosis, y a 10 CMI para ver si se obtenía un efecto máximo.

2.2.2.7. Influencia del tiempo de exposición al antimicrobiano

En general, la mayoría de los estudios se hacen con tiempos de exposición que oscilan entre 0.5 y 2 horas, pero todos los autores coinciden en que una prolongación del tiempo de exposición del microorganismo al antimicrobiano produce un aumento en la duración del EPA (162, 192, 199, 203, 204, 206, 207). Y al igual que ocurre con la

concentración, el EPA aumenta con el tiempo de exposición al antibiótico hasta un punto de máxima respuesta, a partir del cual ya no se produce un mayor aumento del mismo.

Sin embargo, un EPA máximo es difícil de determinar con algunos antimicrobianos que por su rápida acción bactericida (más a concentraciones elevadas o con exposiciones largas) nos originarían una disminución significativa del inóculo con la consiguiente sobreestimación del EPA.

El tiempo de exposición también debería quedar estandarizado por ser otro de los factores con más influencia, lo que permitiría poder comparar resultados entre diversos estudios. Con este fin, MacKenzie y Gould (202) proponen estandarizar el tiempo de exposición en 2 horas, por lo que ese ha sido el tiempo empleado para la realización de este estudio.

2.2.2.8. Influencia del método de eliminación del antimicrobiano

El método para eliminar el antimicrobiano del medio, una vez que se ha terminado el periodo de exposición, puede tener una gran incidencia sobre los resultados.

La técnica más empleada es la de **centrifugación y lavados repetidos**. Este método es aplicable a todos los antimicrobianos, y se realiza sometiendo a los caldos de cultivo a centrifugación a 1200 g durante 5-10 minutos, retirando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet de las bacterias en medio fresco libre de fármaco (208, 209, 210, 211, 212). Todos los investigadores han usado al menos dos lavados para asegurar la eliminación total de los antimicrobianos. Con eliminación del 90% del sobrenadante, dos lavados reducen la concentración de antibiótico unas 100 veces (162, 192, 213). Con decantación completa del sobrenadante, dos lavados pueden reducir las concentraciones cerca de 10.000 veces (214).

El lavado "per se" puede causar una reducción temporal de la tasa de crecimiento bacteriano (215), y ello se ha atribuido a diferentes factores como son la disminución de la temperatura durante la centrifugación, los efectos mecánicos y osmóticos de la centrifugación sobre las bacterias y la disminución en el acceso de las bacterias a los nutrientes del medio pudiéndose romper la adherencia con lo que el antimicrobiano se eliminaría más fácilmente de la bacteria disminuyendo su efecto. Por ello, cuando se utiliza

este método, es imprescindible utilizar un cultivo de bacterias control no tratadas, las cuales son sometidas al mismo proceso de centrifugación y lavado que las bacterias tratadas.

La técnica de **dilución**, es un método simple para la eliminación rápida del antimicrobiano que consiste en añadir un pequeño volumen del cultivo expuesto al antibiótico a un gran volumen del medio fresco libre del mismo (192, 199, 216). El grado de dilución debe ser lo suficientemente alto para que la concentración del antibiótico en el cultivo diluido no logre afectar al crecimiento normal de los microorganismos control. Se necesitan inóculos iniciales altos, al menos de 10^5 - 10^6 UFC/ml ya que los microorganismos se diluyen en la misma medida que el antimicrobiano.

Este método puede aplicarse a todos los antimicrobianos, pero debe tenerse especial cuidado cuando se utilice con antibióticos con acción bactericida rápida, ya que la dilución puede reducir el número de microorganismos por debajo del rango detectable de forma más fácil que el lavado repetido (160).

Por definición, cuando se determina el EPA no debería quedar ningún residuo del antibiótico tras su eliminación. Sin embargo, con algunas técnicas como por ejemplo la de dilución, cantidades subinhibitorias, pero medibles con técnicas de marcaje, pueden persistir (202). Esto no es más que un reflejo de lo que sucede *in vivo* ya que sería extraordinario si, durante el curso de un tratamiento, las concentraciones del antibiótico cayeran por debajo de niveles detectables en el tiempo entre dosis.

Un método más rápido y simple para eliminar el antimicrobiano es la **inactivación química** del mismo (203, 217, 218). La adición de betalactamasa a los cultivos expuestos inactiva rápidamente a antibióticos betalactámicos, sin embargo, otras clases de antimicrobianos no pueden ser tan fácilmente inactivados.

En ausencia de sustancias inactivadoras adecuadas, la técnica del **filtro de membrana** sería también una buena opción (204, 219). La ventaja potencial de este método que puede aplicarse a todos los antimicrobianos es que los microorganismos se ven menos afectados por la presión osmótica y otros efectos mecánicos de los medios líquidos. Sin embargo, es técnicamente más complicado que la dilución o la inactivación química y consume más tiempo que el modelo en medio líquido.

Por todo lo expuesto y con la experiencia recogida en otros trabajos (161), en este estudio se escogió la combinación de las técnicas de centrifugación y lavados y de dilución

en medio fresco como método para la eliminación del antimicrobiano por ser sencilla y de fácil realización y aplicable a las combinaciones de antimicrobiano/microorganismo utilizadas.

2.2.2.9. Influencia del método de cuantificación del EPA

La técnica más utilizada es la de **recuento de células viables** (192), por lo que en un principio se estimó el período de EPA como un período estacionario de crecimiento que se traducía en un intervalo llano de la curva frente al tiempo (203, 215). Sin embargo, han aparecido otros métodos de seguimiento de la curva de crecimiento como la **medición de cambios en la conductancia eléctrica** (193, 220), **cambios en la concentración intracelular de ATP** (221, 222), **espectrofotometría** (223, 224), **recuento electrónico de partículas** (225) o **cambios en la morfología** (226). Algunos métodos han dado EPA más largos que el recuento en placa, pero en general tienen buena correlación.

En un intento de estandarizar un método para comparar resultados entre varias metodologías, se utiliza la fórmula $EPA = T - C$, descrita en el apartado de materiales y métodos, para cuantificar el EPA. La razón para elegir un incremento de 1 Log_{10} en las UFC/ml es que más allá de este nivel, la tasa de crecimiento de los microorganismos previamente expuestos es idéntica a la de los controles no tratados (162). Así que lo que realmente medimos es el tiempo para alcanzar un crecimiento logarítmico normal.

La técnica de recuento de células viables, fue la que nosotros seguimos tanto para el EPA como para las curvas de letalidad, a pesar de tener dos inconvenientes que pueden inducir a error: las diluciones seriadas y el hecho de asumir que una colonia representa a una sola bacteria.

Las bacterias gramnegativas tienden a filamentarse después de exponerse a los antibióticos betalactámicos con lo que se tomaría un filamento (de 2 a 20 células) como una UFC. Cuando las bacterias tratadas se pasan a un medio sin antibiótico en la hora cero del experimento, los filamentos se dividen en células independientes y estaríamos ante un error porque iniciamos el recuento a partir de un número inferior al que existe y, con el tiempo, se crearía un crecimiento virtual rápido en los cultivos pretratados en relación con el control, justamente por la división del filamento, lo que daría un falso EPA negativo. Esto podría

justificar que sólo se obtenga EPA en bacilos gram negativos cuando trabajamos a concentraciones muy altas de betalactámicos (160, 202).

Por otra parte, con bacterias grampositivas en el recuento en placa puede estimarse un menor efecto letal, debido a que los cocos tratados pueden adherirse unos a otros con mayor facilidad que los no tratados (212) y de esta manera, en la curva de letalidad la cuantificación del número de UFC disminuiría tanto por la acción bactericida del antimicrobiano como por el aumento en su agregación y partiríamos igualmente de un número inferior de UFC en el tiempo cero del EPA. Del mismo modo, puede ser que las bacterias sean viables pero incapaces de formar colonias en medio sólido, con lo que también estaríamos midiendo menos bacterias viables que en la realidad hay (180).

Este tipo de errores pueden corregirse, en parte, cuando se realizan múltiples réplicas del ensayo para no subestimar o sobrevalorar el tiempo EPA.

A pesar de estos inconvenientes, el recuento de UFC es valioso por su economía y su uso extendido, lo que permite comparar resultados (160). Además, como ya se ha mencionado anteriormente, no en todos los casos hay diferencias significativas con los resultados obtenidos con otras técnicas. Realmente lo que interesa es conocer si existe un cambio en la cinética de crecimiento de las bacterias tratadas respecto del control y si ese cambio está dentro de un rango significativo para modificar la dosificación (227).

2.2. ANALISIS DEL METODO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

Con el comienzo de la antibioterapia, aparecen dos hechos significativos para el establecimiento del valor predictivo en cuanto a seguridad y eficacia de los datos obtenidos en los modelos experimentales en animales. El primero fue el que el prontosil, inyectado a ratones a concentraciones entre 0.01 y 1%, no sólo era bien tolerado sino que además protegía a los animales de la muerte debida a infección neumocócica (228). El segundo fue el descubrimiento de la penicilina. A sugerencia de Chain y colaboradores (73) fue estudiada la eficacia de la penicilina en el tratamiento de ratones infectados por bacterias grampositivas, encontrándose su elevado potencial como agente terapéutico, poniéndose de manifiesto un papel más importante que el asignado por Fleming como simple antiséptico local o herramienta de diagnóstico (229). Posteriormente esos resultados obtenidos en ratones se corroboraron en ensayos clínicos en humanos.

Actualmente, la realización de pruebas *in vivo* con antibióticos se reconoce como un nexo de unión indispensable entre las pruebas de sensibilidad *in vitro* y los ensayos clínicos en voluntarios humanos, y el desarrollo de nuevos antibióticos es inconcebible sin pruebas determinantes de su seguridad y eficacia en animales de laboratorio. Pero no hay que olvidar que incluso el mejor modelo animal presenta problemas y limitaciones que pueden afectar seriamente a la calidad de los resultados con ellos obtenidos.

2.2.1. Consideraciones éticas

El uso de animales en la búsqueda de posibles tratamientos forma parte de la investigación biomédica dirigida a lograr una mejora en la salud y estado del bienestar de las personas, pero existe una actitud creciente, no sólo entre la opinión pública sino también en algunos sectores de la investigación biomédica, de rechazo al uso de animales en la investigación.

En 1986 la Unión Europea celebró la European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (230), en la que los estados miembro acordaron que “el hombre tiene una obligación moral para respetar a los animales y debe de considerar su capacidad de sufrimiento y memoria”, por lo que se resolvió limitar el uso de animales con fines experimentales y científicos sólo a aquellos casos necesarios, y que aquellos experimentos que causaran dolor, sufrimiento, malestar o daños irreparables se realizarían sólo con razones justificadas y en la menor cantidad posible.

Nosotros consideramos, que el uso de animales de experimentación en este estudio estaba suficientemente justificado, y en todo momento se trató de utilizar el menor número de animales posibles y de causarles el mínimo daño necesario.

2.2.2. Modelos animales para la evaluación de seguridad

Los estudios con animales para determinar la toxicidad de los antibióticos se debe llevar a cabo con objeto de asegurar su inocuidad. Actualmente, este tipo de estudios están regulados por normativas oficiales, siendo su único problema el que existen ciertas

diferencias anatómicas y fisiológicas entre algunas especies de animales y el hombre, lo cual puede restar valor al carácter predictivo de los datos obtenidos con estas pruebas.

A pesar de estas limitaciones, los test de toxicidad en animales pueden dar indicaciones claras de los posibles efectos a corto y largo plazo, y de las máximas dosis tolerables, constituyendo estos datos un requisito indispensable para los ensayos clínicos.

Los antibióticos utilizados en este estudio están ya comercializados, con lo que ya han pasado estas pruebas de toxicidad.

2.2.3. Modelos animales para la evaluación de eficacia

Al contrario de lo que ocurre con los test de toxicidad, no existen directrices para la realización y evaluación de este tipo de modelos animales. Quizá esta ausencia de normas se deba a las limitaciones que presentan los modelos actuales, a la dificultad para interpretar los resultados obtenidos y al alto grado de variación existente entre los datos obtenidos en este tipo de experimentos entre diferentes laboratorios.

Los modelos animales empleados para demostrar la eficacia de los antimicrobianos se pueden clasificar, de acuerdo con la naturaleza de la infección, en:

- Modelos básicos de “screening”.

El ejemplo más extendido de este tipo de modelos es el de sepsis en ratón, ya que satisface los siguientes requisitos establecidos por O’Grady (231): la infección se produce de manera simple por inyección intraperitoneal de un inóculo bacteriano, el antimicrobiano se administra también de manera sencilla, el experimento es de corta duración y fácilmente reproducible, los resultados son evaluados con facilidad pues suelen ser de todo o nada (p. ej. que el ratón viva o muera), o también se suele calcular la DE_{50} , que se expresa en mg/kg de peso e indica la dosis de antimicrobiano que protege de la muerte al 50% de los animales.

La relevancia de los resultados obtenidos en este modelo está limitada por una serie de factores (232, 233, 234, 235, 236): i) se produce una extraordinariamente rápida diseminación de las bacterias que no es típica de las infecciones en humanos; ii) el antimicrobiano se suele administrar al mismo tiempo que se produce la infección, siendo su efecto más profiláctico que terapéutico; iii) el tamaño del inóculo influye en los resultados;

iv) la farmacocinética y el metabolismo de muchos antimicrobianos no es igual que en el hombre; v) se necesita una estandarización de los animales utilizados, sobre todo si se utilizan ratones, ya que factores como la estirpe, el sexo o la edad pueden influir en los resultados.

- Modelos *ex vivo*.

Se utilizan implantes colocados subcutáneamente o intraperitonealmente, que son infectados con bacterias y posteriormente el animal recibe un tratamiento antimicrobiano. Estos implantes permiten tanto la difusión de los antibióticos como la entrada de fagocitos y anticuerpos, ofreciendo la oportunidad de examinar conjuntamente la eficacia de la acción de los antibióticos y los mecanismos de defensa del hospedador. Este tipo de modelos puede ser de relevancia clínica para infecciones localizadas como los abscesos (233).

- Modelos monoparamétricos.

En estos se mide un único parámetro como indicador de la eficacia del tratamiento antimicrobiano, no prestándose atención a si se produce o no la cura del animal. Los parámetros de estudio pueden ser recuentos bacterianos en determinados tejidos, cambios de la morfología de los microorganismos, o medida de las concentraciones de antimicrobiano que se alcanzan en suero o tejidos (237).

Debido a las presiones existentes para reducir el uso de modelos animales de experimentación, se debe tender mientras sea posible a la utilización de modelos poliparamétricos, de manera que de cada animal se obtengan el mayor número posible de datos.

- Modelos discriminativos.

Son los más complejos técnicamente y son diseñados para mimetizar la forma de inicio y desarrollo de la infección en humanos. Se miden múltiples parámetros de eficacia para finalmente determinar si un determinado antimicrobiano es adecuado o no en el tratamiento de una particular infección en humanos. También se utiliza para comprobar la validez de una nueva estrategia terapéutica, como por ejemplo nuevas combinaciones de antimicrobianos, nuevos regímenes de dosificación, o terapias combinadas con agentes antiinflamatorios o inmunoestimuladores, etc.

Zak y Sande describen los criterios a seguir para conseguir el modelo discriminativo ideal (235):

- 1.- Técnica de infección simple.

2.- Microorganismo patógeno tanto para el hombre como para el animal de experimentación.

3.- Vía de entrada, diseminación y tejido/s infectados idénticos o similares a la humana.

4.- Gravedad curso y duración de la infección predecible, reproducible y fácilmente analizable.

5.- Sensibilidad a la quimioterapia medible y reproducible.

En la práctica es casi imposible reunir todos estos criterios, aunque a juicio de los mismos autores (235) existen ejemplos claros de modelos que se ajustan a ellos como son los modelos de endocarditis en conejos o ratas, neumonía en cobayas o perros inmunodeprimidos, osteomielitis en conejos o ratas, algunos modelos de infección del tracto urinario en ratas y cerdos, meningitis en conejos, infecciones oculares, candidiasis oral en ratas, e infección por *Cryptococcus* en cobayas o conejos.

Existe controversia sobre que tipo de modelo, según lo anteriormente expuesto, es el modelo de neumonía en ratón utilizado en este estudio. Para algunos autores (238) se trata un modelo de "screening", mientras que para otros (239) se trata de un modelo discriminativo. Así, Wilson y Rayner (239) hacen un listado de modelos animales que consideran discriminativos, entre los que se encuentra el modelo de Pennington (20, 21, 240, 241) y el de Azoulay-Dupuis *et al.* (22, 23, 24, 163, 242), que son modelos en los que nos hemos basado para conseguir el utilizado en este trabajo. Además, si vemos si nuestro modelo se ajusta a las 5 normas descritas por Zak y Sande, y ya mencionadas anteriormente, encontramos que se ajusta a todas menos a la 2ª. Es decir, la técnica de infección es simple, la vía de entrada y el tejido infectado, al igual que en el hombre, son la orofaringe y el pulmón respectivamente, y la diseminación ocurre igual que en la neumonía en humanos, aunque es cierto que en el ratón ocurre de manera más rápida y fulminante, la gravedad, curso y duración de la infección es predecible, reproducible y fácilmente analizable, bien por supervivencia o por recuento bacteriano en el pulmón, y la sensibilidad a la quimioterapia es medible, igualmente por supervivencia o por recuento bacteriano en el pulmón, y reproducible. Lo que no se cumple completamente es que el microorganismo, en este caso *S. pneumoniae*, sea patógeno tanto para el hombre como para el animal de experimentación, ya que aunque la cepa del serotipo 3 si lo es, las de los serotipos 6 y 9 no lo son y los ratones han de ser inmunodeprimidos previamente.

Por tanto, y según todo lo anteriormente expuesto, nosotros consideramos nuestro modelo de neumonía en ratón como un modelo discriminativo.

2.2.3.1. Modelos animales de infección respiratoria

Entre los modelos animales de infección respiratoria existentes, la diferencia básica radica en la forma de producir la infección, bien intratraquealmente tras exposición quirúrgica, bien mediante aerosoles, o bien por inoculación orofaríngea. De las tres, y tras sopesar los pros y contras de cada una, nosotros elegimos la última. La primera de ellas fue la primera en ser descartada, ya que las técnicas quirúrgicas por una parte hacían que la forma de infección no fuera similar a la que se da en humanos, además de la posibilidad de que se produjeran infecciones locales en la zona de la tráquea abierta que pudieran interferir en el proceso infeccioso en estudio y el problema del bajo número de animales a utilizar por la lentitud de la técnica. La técnica de infección mediante aerosol, era la óptima desde el punto de vista de que se producía la infección de forma idéntica que en humanos, y además permitía trabajar con un elevado número de animales al mismo tiempo por la simplicidad de la técnica; pero descartamos esta técnica por que en la práctica se ha comprobado que los inóculos que se alcanzan con esta técnica pueden ser insuficientes (239). Finalmente elegimos el modelo de inoculación por vía orofaríngea, ya que cumplía el requisito de que la forma de infección fuera similar a la que se da en humanos, era una técnica simple, y permitía trabajar con un número suficientemente elevado de animales en cada experimento.

El primer modelo de inoculación por vía orofaríngea que se encuentra en la literatura es el descrito por Esposito y Pennington, quienes se basan en los trabajos de Saffiotti y cols. (243). Este es el modelo en el que se basan Azoulay-Dupuis y cols. para su modelo de infección, y a su vez este último es el modelo del que se partió para la elaboración del nuestro. Al igual que para estos autores, y como ya describieron Briles y cols. (164), sólo la cepa del serotipo 3 de *Streptococcus pneumoniae* fue virulenta para los ratones, teniendo que inmunodeprimir a los animales para provocar la infección con las cepas de los otros serotipos. Para producir esta inmunodepresión se utilizó ciclofosfamida al igual que el grupo de Azoulay-Dupuis y cols. (163), pero se utilizó una dosis intraperitoneal de 150 mg/kg en los días 4 y 1 previos al día de inoculación, mientras que ellos utilizan una dosis de 150 mg/kg intraperitoneal durante los 3 días previos. Se utilizó ciclofosfamida por su eficacia como inmunodepresor (165, 166), hecho probado en nuestro laboratorio. Existe

algún estudio en el que se menciona la capacidad de ciclofosfamida a través de su metabolito, acroleína, de inhibir el crecimiento de células tanto eucariotas como procariotas (244); serían necesarios muchos más trabajos para poder generalizar esta idea, puesto que a pesar de este supuesto, se consiguió el inicio y posterior desarrollo de la infección.

El inóculo bacteriano utilizado estaba en fase exponencial de crecimiento, y mientras que en este estudio se procedió a centrifugar y lavar las bacterias en solución salina dos veces antes de ajustar espectrofotométricamente la concentración bacteriana, el grupo de Azoulay-Dupuis y cols. no realizaba esta operación. El tamaño del inóculo variaba en nuestro caso y el suyo en función del serotipo de la cepa de la que se tratase. Los animales eran anestesiados con 0.2 ml de pentobarbital sódico al 0.65%, colgados de los incisivos superiores y canulados orotraquealmente en ambos casos, siendo introducidos 0.06 ml en nuestro caso y 0.04 ml en el suyo. El que los animales permanecieran 5-10 minutos colgados, y que luego se situaran inclinados aproximadamente 45° hasta que se despertaran de la anestesia con objeto de impedir que expulsaran la suspensión introducida sucedía en ambos modelos.

La raza de ratones utilizada en ambos modelos no fue la misma, lo cual dificultará la posterior comparación de resultados. En el presente estudio se utilizaron ratones BALB/c mientras que ellos utilizaban ratones C57BL/6 en cuyo caso se producía una neumonía subaguda no comparable con la que se producía en nuestros ratones, o ratones Swiss en cuyo caso se producía una neumonía aguda comparable con la que se producía en nuestro modelo (23). Coincide en ambos casos el que los animales eran hembras, de edad 8-12 semanas, y 20-22 g de peso. El número de animales por grupo de tratamiento en ambos casos fue de aproximadamente 15 animales.

Para los estudios de supervivencia, nuestro protocolo de administración de antibióticos también coincidía con el suyo, 6 dosis espaciadas 12 horas, no coincidiendo el inicio del tratamiento, 5, 19 y 31 horas p.i. en nuestro caso y variable en su caso: 18, 48, 72 y 96 horas p.i. en el caso de neumonía subaguda (22), o 3 (242) o 6 y 18 (163) horas p.i. en el caso de neumonía aguda. Se pretendía estudiar hasta que punto el momento en que se iniciaba el tratamiento influía en la respuesta a este, y por ello se eligió iniciar el tratamiento a un tiempo en que todavía no existieran síntomas de la infección (5 horas p.i.), a un tiempo en que ya existieran manifestaciones externas como decaimiento, pelo erizado, o dificultad para respirar (19 h p.i.) y transcurrido un tiempo (12 horas) desde el inicio de estas manifestaciones (31 horas p.i.).

Para la realización de las curvas de letalidad, el tratamiento en ambos casos es de 6 dosis espaciadas 12 horas, variando igualmente el momento del inicio del tratamiento, que en nuestro caso fue siempre de 19 horas p.i.. Se utilizaron 3 ratones por punto, sacrificándolos en intervalos de tiempo similares en ambos casos. Asimismo, en ambos casos los pulmones eran homogeneizados en solución salina, nosotros en 5 ml y ellos en 2 ml, lo cual puede dar lugar a diferencias ya que el resultado se expresa como UFC por ml de homogeneizado de pulmón en ambos casos. Ambos modelos emplean la técnica del recuento de colonias en placas de agar sangre. En ambos casos los hemocultivos se realizaron por cultivo de sangre obtenida por punción intracardiaca. Los animales se sacrificaban al inicio del tratamiento con objeto de establecer la concentración bacteriana de la que partíamos, a las 8 horas tras la 1ª inyección con objeto de determinar la eficacia de una sola dosis, tras 12 horas tras la 2ª, 4ª o 6ª inyección para observar la evolución del proceso y si se producía o no la erradicación del neumococo del pulmón, y si el tratamiento tenía éxito y los animales sobrevivían se sacrificaban animales a las 84 horas (tres días y medio) tras la 6ª y última inyección con objeto de determinar si una vez finalizado el tratamiento se reproducía la infección o por el contrario se confirmaba la total erradicación del neumococo del pulmón.

En cuanto a los estudios farmacocinéticos, en ambos casos se realizaron mediante la técnica del bioensayo. Esta técnica del bioensayo mediante pocillos utilizada para detectar concentraciones fisiológicas de los antimicrobianos en suero y tejidos cercanas o superiores a la CMI, ha demostrado una buena sensibilidad puesto que hemos obtenido coeficientes de correlación r^2 muy cercanos a la unidad (0.98 para amoxicilina y 0.97 para ciprofloxacino). La precisión de este método, aunque algo inferior a la obtenida por HPLC, es comparable (245). No se determinaron los niveles de ácido clavulánico, ya que al no tener este compuesto actividad bactericida sobre *S. pneumoniae* ni poseer este microorganismo actividad betalactamasa, nos pareció más interesante centrarnos en amoxicilina y ciprofloxacino. Se determinaron los niveles no sólo en suero, sino también en pulmón, y se hizo en animales sin infectar e infectados con objeto de determinar si la existencia de infección favorecía o no el que se alcanzaran unos niveles más altos o que estos permanecieran elevados más tiempo.

3. ANALISIS DE LOS RESULTADOS

3.1. MODELO *IN VITRO*

3.1.1. CMI y CMBs

Se definen como cepas de *S. pneumoniae* sensibles a amoxicilina aquellas con CMI $\leq 0.06 \mu\text{g/ml}$, parcialmente resistentes con $0.1 \mu\text{g/ml} \geq \text{CMI} \leq 1 \mu\text{g/ml}$, y altamente resistentes con $\text{CMI} \geq 2 \mu\text{g/ml}$ (70). Según esto la cepa del serotipo 3 que era sensible a penicilina también es sensible a amoxicilina, la del serotipo 6 que era parcialmente resistente o de resistencia intermedia a penicilina también lo es a amoxicilina, y la del serotipo 9 que era resistente a penicilina también lo es a amoxicilina.

La actividad del ácido clavulánico frente a estas cepas es escasa, y combinado con amoxicilina no influye en la actividad de esta última ya que ni varían las CMI ni las CMBs.

Ciprofloxacino tiene una actividad moderada frente a estas cepas con CMI entre 0.5 y $1 \mu\text{g/ml}$, siendo el punto de corte de ciprofloxacino para el neumococo de $2 \mu\text{g/ml}$ (246), destacando que las CMBs son una dilución más elevada que las CMI y que en el caso de las cepas de los serotipos 3 y 6 son de $2 \mu\text{g/ml}$. No se observa un aumento de sensibilidad a ciprofloxacino en las cepas resistentes a penicilina y amoxicilina respecto de la cepa sensible.

3.1.2. Curvas de letalidad

La concentración de antimicrobiano utilizada para la realización de estas curvas de letalidad no es la misma para las tres cepas, ya que las tres poseen diferente sensibilidad, por lo que siempre se utilizaron concentraciones de 1, 4 y 10 veces su CMI, con objeto de que la relación dosis/CMI fuera constante para las tres cepas y se pudieran realizar comparaciones. Cabría esperar que un aumento en la concentración de antimicrobiano se tradujera en un mayor efecto antibacteriano, pero nosotros observamos que esto no siempre ocurría. Así, para la cepa del serotipo 3 con ambos antimicrobianos se observó un mayor descenso de la viabilidad bacteriana a concentraciones de 4 y 10 CMI que de 1 CMI, pero no existían diferencias (salvo en alguna hora) entre el descenso en la viabilidad producida por el tratamiento con 4 y 10 CMI (Tabla 2). En la cepa del serotipo 6 ocurre lo mismo en el caso de ciprofloxacino y en las 6ª y 8ª horas de la exposición a amoxicilina (Tabla 3). En

cambio, en la cepa del serotipo 9 se observa esto para ciprofloxacino, mientras que para amoxicilina sólo existe un mayor descenso de la viabilidad bacteriana con la concentración de 10 CMI respecto a la de 1 CMI en la 2ª y 8ª hora de exposición (Tabla 4).

Si lo que se compara es la eficacia de amoxicilina/clavulánico y ciprofloxacino (Tablas 2, 3 y 4) y nos fijamos en lo que ocurre tras ocho horas de exposición antimicrobiana (Tabla I), amoxicilina/clavulánico es el más eficaz para la cepa del serotipo 3 a cualquiera de las concentraciones ensayadas, ciprofloxacino es el más eficaz para la cepa del serotipo 6 a cualquiera de las concentraciones ensayadas, y amoxicilina es más eficaz a 1 CMI mientras que ciprofloxacino lo es a 10 CMI para la cepa del serotipo 9.

TIEMPO (h)	1 CMI	4 CMI	10 CMI
Serotipo 3	A/C	A/C	A/C
Serotipo 6	CIP	CIP	CIP
Serotipo 9	A/C	A/C = CIP	CIP

Tabla I. Representación de que antimicrobiano produce un mayor descenso de la viabilidad bacteriana de cada una de las cepas estudiadas tras ocho horas de exposición continua.

Al estudiar si amoxicilina/clavulánico y ciprofloxacino tienen efecto bactericida, y comparar lo que ocurre a cada concentración y para cada cepa vemos lo que se refleja en la tabla II. Para la cepa del serotipo 3 mientras que amoxicilina/clavulánico tiene efecto bactericida a cualquier concentración ciprofloxacino sólo lo tiene a 10 CMI, para la cepa del serotipo 6 amoxicilina/clavulánico no posee efecto bactericida a ninguna concentración ensayada y si lo presenta a 4 y 10 CMI de ciprofloxacino, y para la cepa del serotipo 9 los dos antimicrobianos tienen efecto bactericida a 4 y 10 CMI.

	A/C			CIP		
	1 CMI	4 CMI	10 CMI	1 CMI	4 CMI	10 CMI
Serotipo 3	+	+	+	-	-	+
Serotipo 6	-	-	-	-	+	+
Serotipo 9	-	+	+	-	+	+

Tabla II. Existencia de efecto bactericida con cada antimicrobiano para cada una de las cepas estudiadas.

En los casos que existe efecto bactericida a diferentes concentraciones de un mismo antimicrobiano para una misma cepa, se observa que este se alcanza antes cuanto mayor es la concentración de antimicrobiano utilizada (Tabla 5).

A pesar de que se han publicado muchos estudios de sensibilidad *in vitro* de los neumococos a diferentes antimicrobianos mediante la determinación de sus CMIs, existen muy pocas referencias en la literatura de estudios de sensibilidad realizados mediante curvas de letalidad, y aún es más reducido el número de publicaciones de este tipo en las que los antimicrobianos utilizados son amoxicilina/clavulánico o ciprofloxacino. Jacobs y cols. (247) encontraron un aumento paradójico en la viabilidad bacteriana en cuatro de las ocho cepas de neumococo expuestas a ciprofloxacino, hecho que no ocurre en ninguna de las tres cepas utilizadas por nosotros. Pankuch y cols. (248, 249) y Visalli y cols. (250) ensayan utilizando esta metodología varios antimicrobianos entre ellos ciprofloxacino y amoxicilina/clavulánico, encontrando que con ciprofloxacino las concentraciones con las que se alcanza actividad bactericida son muy próximas al punto de corte (2 µg/ml) para este antimicrobiano, mientras que destacan la actividad bactericida alcanzada con amoxicilina/clavulánico (249).

La comparación de nuestros resultados con los obtenidos por otros autores es difícil pues las cepas utilizadas por cada uno son diferentes en cuanto a serotipo y sensibilidad. Liñares y cols. (251) estudian mediante curvas de letalidad la actividad bactericida de cinco betalactámicos, entre ellos amoxicilina, frente a tres cepas de *S. pneumoniae*, una de ellas del serotipo 3 y sensible a penicilina, otra del serotipo 6 y de resistencia intermedia a penicilina y otra del serotipo 23 y resistente a penicilina. En la tabla III se recogen las CMIs

de esas cepas para amoxicilina, las concentraciones utilizadas para el ensayo y la existencia o no de efecto bactericida. A 1 CMI, para la cepa del serotipo 3 no obtienen efecto bactericida mientras que nosotros sí, para la cepa del serotipo 6 no obtienen efecto bactericida como nosotros, y para la cepa resistente aunque es de diferente serotipo a la nuestra tiene la misma sensibilidad a amoxicilina y al igual que nosotros obtienen efecto bactericida.

	CMI/CMB_{amoxicilina}	Concentración	Efecto bactericida
Cepa I serotipo 3	0.03/0.03	1 CMI	-
		2 CMI	+
Cepa II serotipo 6	0.06/0.12	1 CMI	-
		2 CMI	+
Cepa III serotipo 23	2/2	1 CMI	+
		2 CMI	+

Tabla III. Efecto bactericida de amoxicilina (251).

3.1.3. Efecto Postantibiótico

Tanto amoxicilina/clavulánico como ciprofloxacino a las concentraciones ensayadas inducen un EPA significativo (mayor a 0.5 h) en las tres cepas de este estudio, a excepción de ciprofloxacino a 1 CMI para la cepa del serotipo 6.

Se confirma en este estudio que el EPA y su duración están correlacionados con la concentración ensayada de antimicrobiano. Esto está en consonancia con lo observado por la mayoría de los autores (162, 182, 192, 204, 205) de que incrementos en la concentración prolongan el EPA hasta un punto de máxima respuesta por encima del cual no se observa un aumento significativo del EPA. Así, la duración del EPA fue mayor a mayor concentración utilizada pero para cada combinación antimicrobiano/cepa este efecto se dió a partir de una

concentración diferente. Para amoxicilina/clavulánico/cepas serotipos 3 y 9 y para ciprofloxacino/cepa serotipo 3 con 10 CMI se observaron EPAs más largos que con 1 CMI, no observándose diferencias en la duración del EPA con 4 CMI respecto de 1 CMI ni con 10 CMI respecto de 4 CMI. En cambio para amoxicilina/clavulánico/cepa serotipo 6 y ciprofloxacino/cepas serotipos 6 y 9, con 4 CMI y con 10 CMI respecto de 1 CMI se observan EPAs más largos, no habiendo diferencias entre los EPAs producidos por 10 CMI respecto de los producidos por 4 CMI. En este último caso el punto de máxima respuesta estaría alrededor de 4 CMI, y por eso no existirían diferencias entre 4 y 10 CMI.

Los resultados obtenidos hasta el momento sobre el EPA (160, 192) destacan el que las quinolonas presentan un EPA de larga duración frente a organismos grampositivos y gramnegativos, y que los betalactámicos provocan un EPA menor que es dependiente del tipo de organismo diana empleado, siendo hasta de algunas horas con algunos organismos grampositivos. Con los resultados obtenidos en este estudio no se puede establecer que antimicrobiano de los ensayados produce EPAs más largos sobre *S. pneumoniae*, ya que se observa que dependiendo de la cepa de *S. pneumoniae* y de la concentración de antimicrobiano utilizada el resultado es diferente. Para la cepa del serotipo 3 amoxicilina/clavulánico y ciprofloxacino inducen EPAs de la misma duración independientemente de la concentración ensayada, para la cepa del serotipo 6 ciprofloxacino inducía un mayor EPA que amoxicilina/clavulánico pero sólo a 10 CMI siendo de igual duración a otras concentraciones, y para la cepa del serotipo 9 a 1 y 4 CMI amoxicilina/clavulánico inducía un mayor EPA que ciprofloxacino igualándose la duración de estos a 10 CMI.

El mecanismo preciso por el que se establece el EPA es desconocido, pero múltiples factores deben estar implicados. Aunque el término EPA fue definido para enfatizar el hecho de que la previa exposición al fármaco es la causante del fenómeno, otras teorías se inclinan a destacar el papel de las concentraciones subinhibitorias del antibiótico, al que están expuestas las bacterias tras la eliminación del antibiótico del medio, en la presentación de este fenómeno. Algunos autores sugieren que el tiempo necesario para la liberación del antibiótico de sus receptores sería el tiempo de recuperación del crecimiento bacteriano (160), para otros autores, el EPA sería el tiempo de resíntesis de las proteínas y enzimas afectados por la acción del fármaco (252).

Se considera que es un fenómeno que se desarrolla fundamentalmente dependiendo de la combinación antimicrobiano-microorganismo y, en muchos casos, es multifactorial. Se

asume que el EPA es el resultado de la inhibición del crecimiento bacteriano como consecuencia de una prolongación del tiempo de latencia. Sin embargo, podría deberse a un aumento en el tiempo de generación o, incluso, una combinación de ambos. El segmento de la fase de crecimiento que está afectada puede calcularse tomando muestras a intervalos muy cortos. Esto ha revelado que en la mayoría de los casos sucede realmente una prolongación de la fase de latencia, excepto para ciprofloxacino (220) que parece que induce una prolongación en el tiempo de generación.

Hasta hace relativamente poco tiempo se consideraba que los betalactámicos producían un EPA sobre los grampositivos pero no sobre los gramnegativos. Sin embargo, los carbapenemes sí inducen EPA en ambas clases de bacterias. Los betalactámicos se fijan a varias PBP, presentes en la membrana citoplásmica, con preferencia en la PBP₂, que induce la formación de esferoplastos. El EPA podría en estos casos reflejar el tiempo requerido por los esferoplastos en resintetizar su pared (221) ya que antes no pueden dividirse. Otra alternativa sería que el EPA representara el período durante el cual la bacteria resintetiza nuevas PBP o el efecto del antimicrobiano que permanece, el cual continúa inhibiendo la actividad de las enzimas recién sintetizadas (253). Otra posibilidad es que el EPA sea el período durante el cual la célula regenera la actividad enzimática después de que el antibiótico se haya liberado desde las dianas; el rango de síntesis de las nuevas enzimas variará según el tipo de bacterias y dentro de cada bacteria, lo que explicaría las diferencias entre unos organismos y otros en sus tiempos de EPA (254).

En el caso de las quinolonas se ha sugerido que el EPA está condicionado por el tiempo que estas tardan en disociarse de sus receptores y difundir fuera de la bacteria (255). Sin embargo, aunque para todas las quinolonas la ADN-girasa parece ser la diana principal, si el valor de EPA varía de unas quinolonas a otras, debemos buscar otras explicaciones adicionales para poder entender dichas divergencias.

3.2. MODELO *IN VIVO*

3.2.1. Determinación de la MDL

Dado que cada una de las cepas utilizadas pertenece a un serotipo diferente y por tanto posee diferente virulencia, es necesario determinar su MDL. Esta fue de 10^5 UFC/r para la cepa del serotipo 3, de 10^7 UFC/r para la cepa del serotipo 6 y de 10^6 UFC/r para la

cepa del serotipo 9. Estos resultados indican la existencia de un diferente grado de virulencia de cada una de las cepas, siendo la más virulenta la del serotipo 3 la cual es capaz de infectar animales inmunocompetentes con la menor MDL de las tres. Las otras dos cepas son similares, siendo algo más virulenta la del serotipo 9 ya que su MDL es una dilución menor que la del serotipo 6.

Algunos autores (256) utilizan para diferentes cepas un inóculo de la misma concentración para producir la infección. En estos casos la concentración del inóculo suele ser elevada para asegurar que incluso las cepas menos virulentas sean capaces de producir infección. Nosotros consideramos que al hacer esto se está utilizando una concentración que puede ser 10 veces la MDL de una cepa, 100 veces la MDL de otra cepa, etc., lo cual impide comparar los resultados obtenidos con cada una de las cepas ensayadas. Con objeto de evitar esto nosotros utilizamos para la realización de todos los experimentos la MDL para cada cepa.

3.2.2. Lesiones histopatológicas

Los estudios de las lesiones histopatológicas revelan que la cepa del serotipo 3 provoca una neumonía abcesificante, mientras que las cepas de los serotipos 6 y 9 producen una neumonía hemorrágica y menos abcesificante, siendo las lesiones más agresivas y agudas. Estas diferencias se podrían deber a que en el caso de las cepas de los serotipos 6 y 9, los animales están inmunodeprimidos, lo cual explica la menor presencia de leucocitos polimorfonucleares y la existencia por tanto de lesiones más agresivas y agudas.

Tateda y cols. (257) recientemente han descrito un modelo de neumonía neumocócica utilizando ratones CBA/J, el cual permite, sin utilizar ningún fármaco inmunosupresivo y con inóculos no muy altos, producir neumonía independientemente del serotipo de la cepa utilizada. Así, con un aislado no mucóide del serotipo 19 se consigue producir la infección pulmonar, describiéndose unas lesiones histológicas similares a las obtenidas por nosotros con la cepa del serotipo 3 con ratones inmunocompetentes.

Por otra parte, hay que destacar que en nuestro modelo con la cepa del serotipo 3 las lesiones aparecen antes, siendo estas máximas a las 19+24 horas, mientras que con las cepas de los serotipos 6 y 9 la evolución de la infección es más lenta, no apareciendo lesiones máximas hasta las 19+72 y 19+ 48 horas respectivamente. Esto confirmaría que la

cepa del serotipo 3 es la más virulenta, seguida de la del serotipo 9 y por último la del serotipo 6.

3.2.3. Curvas de supervivencia

El efecto del tratamiento de amoxicilina/clavulánico y ciprofloxacino en la supervivencia de animales infectados en nuestro modelo de infección respiratoria quedó perfectamente detallado en el capítulo de resultados. Es difícil comparar estos resultados con los obtenidos por otros autores, ya que las condiciones experimentales difieren en cada caso; por ejemplo, ni las cepas bacterianas ni los animales son los mismos, las horas de inicio del tratamiento difieren, etc. A pesar de esto, en la tabla IV se comparan parte de los resultados obtenidos por nosotros con los de otros grupos.

En los tres casos se trata de un modelo de neumonía neumocócica en ratón, utilizándose diferentes cepas de *S. pneumoniae* en cuanto a sensibilidad y serotipo, y consistiendo el tratamiento en todos los casos en 6 dosis, espaciadas por 12 horas en el modelo de Azoulay-Dupuis y cols. y el nuestro, y espaciadas por 8 horas en el de Gisby. El inicio del tratamiento y vía de administración también varían, especificándose en la tabla.

Para amoxicilina, Azoulay- Dupuis y cols. con una cepa del serotipo 3 de la misma sensibilidad a este antimicrobiano que la empleada por nosotros, con la misma dosis de 5 mg/kg obtienen el mismo 100% de supervivencia que nosotros, mientras que para la cepa de resistencia intermedia una dosis de 50 mg/kg produce una supervivencia del 90%. En cambio nosotros obtenemos una supervivencia de 100% para la cepa de resistencia intermedia con una dosis de 25 mg/kg. Estas diferencias se podrían deber a que las cepas corresponden a diferentes serotipos. Para ciprofloxacino, se ve como en los tres modelos el resultado es diferente para cada cepa aun empleando dosis iguales o similares.

En los tres modelos se observa claramente que con amoxicilina o amoxicilina/cavulánico se obtienen mejores resultados de supervivencia que con ciprofloxacino, incluso aunque las concentraciones utilizadas de la primera sean mucho menores (hasta 10 veces menos) que de ciprofloxacino, e incluso para las cepas resistentes a penicilina.

	CMI/CMB µg/ml	Dosis mg/kg	Superviv. (%)	CMI/CMB µg/ml	Dosis mg/kg	Superviv. (%)
A-D (163)^a	AMOXICILINA			CIPROFLOXACINO		
PS ^d , Ser 3	0.03/0.03	5	100	1/2	100	50
PR ^d , Ser 23	0.5/1	50	90	1/2	50	7
					100	92
Gisby (256)^b	A/C (2/1)			CIPROFLOXACINO		
PS, 1629	0.01	10/5	80	1	40	20
		20/10	100		80	40
					160	80
PS, 7	0.01	10/5	100	0.5	40	40
					80	80
					100	100
García, Y.^c	A/C (4/1)			CIPROFLOXACINO		
PS, Ser 3	0.03/0.03	5	100	1/2	50	0
PI ^d , Ser 6	0.25/0.25	25	100	1/2	50	81.81
PR, Ser 9	2/2	50	100	0.5/1	50	27.27

Tabla IV. Efecto del tratamiento de amoxicilina, amoxicilina/cavulánico (A/C) y/o ciprofloxacino en la supervivencia, en diferentes modelos de infección respiratoria por *S. pneumoniae*.

^a Azoulay-Dupuis y cols. Inicio tratamiento: 6 horas p.i., s.c.

^b Gisby y cols. Inicio tratamiento: 1 hora p.i., v.o.

^c Inicio tratamiento: 5 horas p.i., s.c.

^d PS, PI y PR: sensible, de resistencia intermedia y resistente a penicilina.

Por otro lado, en nuestros resultados se observa claramente cómo retrasos de 12 o 24 horas en el inicio del tratamiento, de 5 horas p.i. a 19 horas p.i. o a 31 horas p.i., se corresponden con una importante disminución del éxito de este para las tres cepas y para ambos antimicrobianos, aunque este efecto es más acusado en el caso de ciprofloxacino.

3.2.4. DE₅₀ Y DE₉₀

Si se comparan los valores obtenidos para cada cepa, vemos que para la cepa del serotipo 6 para que la supervivencia pase del 50% al 90%, se necesita aumentar la dosis de amoxicilina/clavulánico en 3.25 veces, mientras que para la cepa del serotipo 9 el aumento de la dosis debe ser de 2.09 veces.

Si se comparan las DE₅₀ obtenidas para cada cepa, la DE₅₀ para la cepa del serotipo 9 es 3.4 veces mayor que la del serotipo 6, y considerando que fuera 5 la de la cepa del serotipo 3, la DE₅₀ para la cepa del serotipo 9 sería casi 5 veces mayor que la de la cepa del serotipo 3.

Si se comparan las DE₉₀ obtenidas para cada cepa, la DE₉₀ para la cepa del serotipo 9 es 2.1 veces mayor que la del serotipo 6, y considerando que fuera 5 la de la cepa del serotipo 3, la DE₉₀ para la cepa del serotipo 9 sería casi 10 veces mayor que la de la cepa del serotipo 3.

Para ciprofloxacino no se pueden calcular estos parámetros al ensayarse sólo una dosis (50 mg/kg), pero como muestran las curvas de supervivencia, cuando el tratamiento comienza a las 19 horas p.i., esa dosis no es capaz de proteger ni al 50% de los animales en el caso de que la cepa utilizada fuera la del serotipo 3 o la del serotipo 9, y sólo en el caso de la cepa del serotipo 6 la DE₅₀ sería aproximadamente de 50 mg/kg (se obtiene para esa dosis una supervivencia del 54.54%). Para esa misma cepa la DE₅₀ de amoxicilina/cavulánico, como se ve en la tabla 10, es 7.7 veces inferior.

Existe controversia sobre la existencia de correlación entre la actividad antibacteriana de los antibióticos y su eficacia en infecciones sistémicas en ratones, es decir si existe correlación entre la CMI y la DE₅₀. Zak y Sande (234) en 1982 publicaban un estudio estadístico de 2000 sustancias, encontrando que al menos en un 40% de los casos había discrepancias entre los valores de la CMI y la DE₅₀. Entre los factores que mencionan

como posibles responsables de estas discrepancias están la disparidad que existe entre las condiciones estáticas y relativamente simples bajo las que se determinan las CMI y las condiciones dinámicas de los modelos *in vivo*, en los que la acción de los antibióticos depende de muchas variables específicas de la droga, huésped y bacteria y de las interacciones que se establecen entre estos factores. Para estos autores, estas discrepancias rechazan la generalizada opinión de que el ratón es un simple tubo de ensayo viviente. En contraposición, Knudsen y cols. (258) en 1995 publican un estudio en el que se demuestra la existencia de correlación entre las actividades *in vitro* e *in vivo* de penicilina frente a 10 cepas de neumococos con diferente sensibilidad a penicilina. En su trabajo encuentran una alta correlación entre el log CMI y el log DE₅₀, lo cual indica que la CMI es altamente eficaz en la predicción de la dosis de penicilina necesaria para que esta sea eficaz *in vivo*. Este trabajo se ha realizado sólo con tres cepas, de manera que son pocas para establecer matemáticamente si existe una correlación entre la CMI y la DE₅₀ para amoxicilina, pero si se observa que un aumento en la CMI se corresponde con un aumento de la DE₅₀.

3.2.5. Curvas de letalidad *in vivo*

La elaboración de estas curvas de letalidad *in vivo*, nos permite comprobar que realmente hay presencia de *S. pneumoniae* en los pulmones de los animales infectados y por tanto junto con los datos aportados por el estudio histológico, podemos afirmar que se está produciendo una infección neumónica.

A la vista de los resultados obtenidos en estas curvas, se puede decir que para la cepa del serotipo 3 el tratamiento con (5/1.25) mg/kg de amoxicilina/clavulánico resultó más eficaz que el de 50 mg/kg de ciprofloxacino desde la primera dosis, y que fue capaz de erradicar la bacteria de los pulmones de los animales.

Para la cepa del serotipo 6 el tratamiento con (25/6.25) mg/kg de amoxicilina/clavulánico resultó eficaz desde la primera dosis en relación con aquellos animales que no recibieron tratamiento (controles), mientras que el tratamiento con 50 mg/kg de ciprofloxacino no lo fue, y sólo amoxicilina/clavulánico fue capaz de erradicar la bacteria de los pulmones de los ratones infectados.

Para la cepa del serotipo 9 aunque ni el tratamiento con (50/12.5) mg/kg de amoxicilina/clavulánico ni con 50 mg/kg de ciprofloxacino, resultó eficaz tras las primeras

dosis en relación con aquellos animales que no recibieron tratamiento (controles), y que aunque hasta después de la 6ª dosis tampoco hubo diferencias entre ambos antimicrobianos, al final sólo amoxicilina/clavulánico fue capaz de erradicar la bacteria de los pulmones de los ratones.

Es decir, que se confirman los resultados obtenidos en los estudios de supervivencia, de modo que para las tres cepas estudiadas, incluso para las que presentan resistencia a penicilina y a amoxicilina, el tratamiento con amoxicilina/clavulánico es más eficaz que el tratamiento con ciprofloxacino en la erradicación de las bacterias de los pulmones de los animales infectados. Otros autores (163, 256) obtienen resultados similares a los nuestros, destacando también la mayor eficacia de amoxicilina sobre ciprofloxacino.

No podemos hacer una evaluación conjunta de las curvas de letalidad *in vitro* e *in vivo* puesto que, además de que las concentraciones utilizadas no coinciden, *in vitro* los microorganismos han sido expuestos a una sola dosis de antimicrobiano y la concentración permanece constante a lo largo del tiempo, e *in vivo* a los animales se les han administrado 6 dosis, cuya concentración variará a lo largo de tiempo, influyendo además el metabolismo del animal.

3.2.6. Presencia de microorganismos en sangre

Es importante conocer la capacidad invasiva de cada una de las cepas estudiadas, y conocer por tanto su facilidad para pasar de los pulmones a la sangre y producir un proceso bacteriémico que agudice la situación, en este caso del animal infectado. Así, las tres cepas son capaces de realizar este paso a la sangre, observándose diferencias según los serotipos; las cepas de los serotipos 3 y 9 producen un hemocultivo positivo en el 100% de los animales a las 19 horas p.i., mientras que para la cepa del serotipo 6 esto no ocurre hasta las 27-43 horas p.i.

Por otra parte, de nuevo amoxicilina/clavulánico se muestra más eficaz que ciprofloxacino, en esta ocasión a la hora de negativizar los hemocultivos de *S. pneumoniae*. Esta negativización con amoxicilina/clavulánico ocurre antes cuanto más sensible es la cepa, así ocurre a las 43 horas p.i. para la cepa sensible (serotipo 3), a las 67 horas p.i. para la cepa de resistencia intermedia (serotipo 6) y a las 91 horas p.i. para la cepa resistente (serotipo 9).

3.2.7. Parámetros farmacocinéticos

Al haber ensayado nosotros tres dosis diferentes para amoxicilina y una para ciprofloxacino, y haber determinado los niveles en suero y pulmón, y a su vez en animales sin infectar (controles) e infectados, el volumen de datos obtenidos es grande, lo cual dificulta su interpretación. Si empezamos por comparar las C_{max} alcanzadas, vemos que en general estas son mayores en suero que en pulmón en el caso de amoxicilina y de animales infectados en el caso de ciprofloxacino. Lo mismo ocurre con los $T_{1/2}$ de amoxicilina, son algo mayores en suero que en pulmón, ocurriendo lo contrario para ciprofloxacino. El $T_{máx}$ coincide usualmente para ambos antimicrobianos en 0.5 horas. En general, se puede decir que la infección no modificó los parámetros farmacocinéticos ni para amoxicilina ni para ciprofloxacino, pues las C_{max} , $T_{1/2}$ y ABC en animales no infectados e infectados son muy similares, habiendo sólo diferencias notables en el ABC de pulmones de animales infectados respecto de los controles con las dosis de 25 y 50 mg/kg de amoxicilina. Azoulay-Dupuis y cols. (163) tampoco encuentran que la infección haga variar los parámetros farmacocinéticos de ciprofloxacino, independientemente de que este se administre por vía oral o subcutánea. Por otra parte, si nos fijamos en el tiempo que las concentraciones de antimicrobiano superan la CMI ($T > CMI$), vemos que para amoxicilina con las DE_{50} para cada cepa se obtienen valores no muy diferentes entre sí, y que con ciprofloxacino se obtienen valores idénticos para las cepas de los serotipos 3 y 6 (ya que tienen la misma sensibilidad), y valores más elevados para la cepa de serotipo 9 (de mayor sensibilidad que las anteriores). Por último, si comparamos amoxicilina y ciprofloxacino, a la dosis de 50 mg/kg vemos que las $C_{máx}$, $T_{1/2}$ y ABC de ciprofloxacino son mayores que las de amoxicilina.

El hecho de la existencia de muchas similitudes en la anatomía y fisiología entre las distintas especies de mamíferos ha sido la base del uso de modelos animales en la investigación biomédica. Pero, no hay que olvidar que también existen importantes diferencias a tener en cuenta. Así, aunque sean las propiedades fisicoquímicas propias de cada agente antibacteriano las que regulan sus propiedades farmacocinéticas en todas las especies animales (259), hay que tener en cuenta que los procesos de absorción, excreción y distribución pueden ser influidos por las diferencias entre especies, no sólo anatómicas y fisiológicas, sino también metabólicas (260, 261). Ejemplos de esto es el hecho de que los animales pequeños eliminan los fármacos más rápidamente (262, 263, 264), o las diferencias que pueden existir en la unión de los antibióticos a proteínas séricas entre los animales y el

hombre (58). Todo esto nos debe hacer recordar que debemos ser cautos a la hora de interpretar los datos farmacocinéticos obtenidos en modelos animales (265).

En la tabla V aparecen las concentraciones y $T_{1/2}$ que se alcanzan en suero humano tras la administración de 625 mg de amoxicilina/clavulánico, y 500 o 750 mg de ciprofloxacino. Si comparamos nuestros datos con los allí reflejados vemos que con la concentración de 50 mg/kg de amoxicilina se obtiene una $C_{máx}$ en suero de animal infectado de 7.67 $\mu\text{g/ml}$ muy similar a la obtenida en humanos, y con una $T_{1/2}$ también similar (1 hora frente a 56.4 min.). En cambio con una dosis de 50 mg/kg de ciprofloxacino los niveles en suero son mucho mayores (9.17-9.33 $\mu\text{g/ml}$) que los 2.96 $\mu\text{g/ml}$ obtenidos en humanos con una dosis de 750 mg, aunque los valores de $T_{1/2}$ obtenidos en nuestro caso son muy inferiores (1.1-1.33 horas frente a 320.4 min.).

	Dosis (mg)	Csuero ($\mu\text{g/ml}$)	$T_{1/2}$ (min)
Amoxicilina/ clavulanico	500	8.0 ⁽²⁶⁶⁾	56.4 ⁽²⁶⁶⁾
	125	2.9 ⁽²⁶⁶⁾	45.4 ⁽²⁶⁶⁾
Ciprofloxacino	500	2.37 ⁽²⁶⁷⁾	292.2 ⁽²⁶⁷⁾
	750	2.96 ⁽²⁶⁷⁾	320.4 ⁽²⁶⁷⁾

Tabla V. Concentraciones y $T_{1/2}$ en suero humano tras la administración de amoxicilina/clavulánico y ciprofloxacino.

4. APLICACIONES CLINICAS

La efectividad de las pautas de administración de los antibióticos se ve influenciada en gran medida por los efectos que las concentraciones de los antibióticos tienen en el lugar de infección sobre la población bacteriana dinámica tras una sola dosis y los efectos acumulativos de dosis múltiples intermitentes. Y estos efectos farmacológicos envuelven, por un lado, a la tasa de actividad bactericida y a la extensión de la supresión del crecimiento de las bacterias en los tejidos y, por otro, al EPA (268), que de ser prolongado permitiría, con dosificación intermitente, que los niveles de antibiótico en suero y tejidos

cayeran por debajo de la CMI durante un intervalo de tiempo considerable sin permitir el recrecimiento bacteriano y la pérdida de eficacia del antimicrobiano. Por otra parte, si bien las concentraciones alcanzadas son, obviamente, una función de la cantidad de droga administrada, también dependen de las características farmacocinéticas de cada antibiótico (269).

Numerosos estudios han demostrado que el tiempo que la concentración de antibiótico se mantiene sobre la CMI ($T > CMI$) se corresponde con una mayor eficacia en el caso de los β -lactámicos (270, 271). Un estudio en el que se comparaban 14 cefalosporinas administradas en una única dosis en un modelo de peritonitis neumocócica en ratón reveló que el único parámetro farmacocinético que se correlacionaba con la DE_{50} era el tiempo que los niveles del fármaco superaban la CMI (272). Knudsen y cols. (258) confirman también, utilizando un modelo de peritonitis neumocócica en ratón, que para *S. pneumoniae* los antibióticos β -lactámicos son concentración-independientes y es $T > CMI$ el factor determinante en la resolución de una infección. Los efectos positivos de altas dosis de amoxicilina para el tratamiento de otitis media por neumococos resistentes a penicilina en ratones han sido demostrados por Barry y cols. (273); asimismo, este mismo efecto positivo de elevadas dosis de amoxicilina ha sido demostrado en un modelo de neumonía neumocócica por cepas resistentes publicado por Soriano y cols. (274), y también es demostrado en el presente trabajo. En este sentido experiencias clínicas ya habían sugerido que un aumento de la dosis de penicilina, siempre que este fuera tolerado por el paciente, era suficiente para que esta droga presentara un efecto positivo frente a infecciones por neumococos resistentes a penicilina (64, 275). Regímenes de dosificación que aseguren concentraciones de penicilina sobre la CMI de la bacteria que está produciendo la infección por el mayor intervalo de tiempo posible, como por ejemplo, frecuente administración, infusión constante o el uso concomitante de probenecid, se sugieren como la forma más eficaz de administrar esta droga para el tratamiento de infecciones causadas por neumococos resistentes a penicilina.

En cambio, los aminoglicósidos y las fluorquinolonas parece que tienen ciertas propiedades farmacocinéticas en común que difieren de las de los β -lactámicos. Así, la capacidad bactericida de las fluorquinolonas se ha demostrado que es concentración-dependiente (276, 277, 278, 279). En este caso la dosificación óptima para las quinolonas sería la administración de elevadas dosis únicas que proporcionaran los elevados niveles en suero necesarios para alcanzar el alto coeficiente C_{max}/CMI necesario (280).

Este trabajo pone de manifiesto la eficacia del uso de amoxicilina para el tratamiento de la neumonía neumocócica, y descarta el empleo de ciprofloxacino. Los estudios *in vitro* reflejan una actividad mayor de amoxicilina/clavulánico que de ciprofloxacino sobre las cepas de los serotipos 3 y 9, con excepción de la cepa del serotipo 6 sobre la que ciprofloxacino tiene una mayor actividad. Este efecto es mucho más significativo y apreciable *in vivo*, donde ciprofloxacino, pese a alcanzar en líneas generales mayores concentraciones en suero y pulmón, fracasa en el tratamiento de la neumonía neumocócica en el ratón, obteniendo sólo resultados también aceptables, pero inferiores a los conseguidos con amoxicilina/clavulánico, para la cepa del serotipo 6. Amoxicilina/clavulánico, en cambio, muestra su eficacia para las tres cepas ensayadas, incluso para la resistente, utilizando una dosis de 50 mg/kg que como ya hemos mencionado es equiparable, en términos de concentración alcanzada en suero, a la dosis de 500 mg de amoxicilina que se suele administrar en adultos para el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio. Hay que destacar, que por una parte las dosis se administraban en intervalos de doce horas y no de ocho, como ocurre en la práctica clínica, lo que hace suponer que dosis inferiores a esos 50 mg/kg serían eficaces si se administraran cada ocho horas, y que por otra parte en el caso de las cepas de resistencia intermedia (serotipo 6) y resistente (serotipo 9), los animales se hallaban inmunodeprimidos, con lo que es de suponer que dosis también inferiores a esos 50 mg/kg serían eficaces en el caso de animales inmunocompetentes. Con respecto a esto último, existen publicaciones que señalan como la neutropenia puede debilitar la actividad *in vivo* de algunos antibióticos β -lactámicos (281).

Los datos recogidos por la experiencia clínica parecen respaldar lo anteriormente expuesto. Friedland y Klugman (282), encontraron que la resistencia a penicilina no estaba asociada con un aumento en la mortalidad en una serie de 208 niños con bacteriemia neumocócica sin infección en el sistema nervioso central y tratados con penicilina, ampicilina o amoxicilina, y lo mismo ocurrió en un estudio con 504 adultos afectados de neumonía neumocócica llevado a cabo por Pallares y cols. (283). Un análisis de la literatura revela pocos casos de presunto fallo del tratamiento de neumonía neumocócica con betalactámicos (284, 285, 286, 287) y de ellos sólo uno, que fue tratado con cefazolin, fue confirmado bacteriológicamente (286). Es por esto que muchos autores sigan considerando las penicilinas como la droga de elección para el tratamiento de la neumonía nemocócica (288, 289).

Existe una paradoja en el uso de penicilina o amoxicilina, ya que aunque por un lado parece que son capaces de curar infecciones por cepas resistentes, por otro lado seleccionan

las cepas resistentes y por tanto su uso favorece o predispone a la infección por estas cepas resistentes. En opinión de Klugman (290), un uso controlado y más restrictivo de estos antimicrobianos podría paliar en parte su capacidad para seleccionar mutantes resistentes.

Respecto a ciprofloxacino, hay muchas dudas respecto a su eficacia (291, 292, 293, 294, 295), aunque queda abierta la posibilidad del uso de nuevas quinolonas como trovafloxacino, las cuales presentan una mayor sensibilidad frente al neumococo (250).

VII. CONCLUSIONES

Del análisis de la metodología utilizada y de los resultados obtenidos en cada uno de los fenómenos estudiados, podemos extraer las siguientes conclusiones:

1.- La actividad *in vitro* de amoxicilina/clavulánico y ciprofloxacino frente a *S. pneumoniae* fue cepa dependiente, de modo que frente a la cepa del serotipo 3 amoxicilina/clavulánico presentó mayor actividad, frente a la cepa del serotipo 6 ciprofloxacino presentó mayor actividad, y frente a la cepa del serotipo 9 ambos antimicrobianos presentaron una actividad semejante.

2.- Amoxicilina/clavulánico y ciprofloxacino indujeron un EPA significativo en las tres cepas estudiadas, a excepción de ciprofloxacino a 1 CMI para la cepa del serotipo 6.

3.- La inoculación por vía orofaríngea se mostró eficaz en la producción de neumonía neumocócica, demostrando los estudios histológicos y los recuentos bacterianos del pulmón la existencia de un proceso neumónico.

4.- La virulencia de cada cepa fue serotipo dependiente, necesitándose diferentes inóculos de cada una para producir la infección. La cepa del serotipo 3 fue la más virulenta, mostrando las cepas de los serotipos 6 y 9 una virulencia inferior.

5.- La cepa del serotipo 3 provocó más rápidamente que las de los serotipos 6 y 9 la aparición de lesiones histológicas importantes en pulmón, ocasionando la cepa del serotipo 3 una neumonía abscesificante y las cepas de los serotipos 6 y 9 una neumonía más hemorrágica.

6.- Un aumento de la CMI se correspondió con un aumento de las DE_{50} y DE_{90} de amoxicilina/clavulánico para *S. pneumoniae*.

7.- El retraso del inicio del tratamiento antimicrobiano supuso un descenso de la eficacia de este, tanto para amoxicilina/clavulánico como para ciprofloxacino.

8.- Amoxicilina/clavulánico se mostró más eficaz que ciprofloxacino en el tratamiento de la neumonía neumocócica para las tres cepas ensayadas, incluso para las que presentaban resistencia a amoxicilina, en cuanto a supervivencia, erradicación de las bacterias de los pulmones y negativización de hemocultivos.

9.- La existencia de infección neumocócica no modificó, en general, los parámetros farmacocinéticos C_{max} , T_{max} , $T_{1/2}$ y ABC ni para amoxicilina ni para ciprofloxacino.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bonora, V. Neumonías extrahospitalarias. *Crónica Antifecciosa*, 1995; 2: 2-3.
- 2.- Donowitz y cols. Acute pneumonia. En: Mandell, GL. y cols. (Eds.). *Principles and practice of infectious diseases*, Vol. I, 4ª ed. Churchill Livingstone, New York 1995; 619-637.
- 3.- Rufi Rigan, G. Neumonías extrahospitalarias. En: Agustí Vidal, A. (Ed.) *Neumología básica*. IDEPSA, Madrid 1986; 209-218.
- 4.- Mensa, L. Neumonía extrahospitalaria. En: Farreras-Rozman (Eds.). *Medicina Interna*, Vol. I, 12ª ed. Doyma, Barcelona 1992; 775-784.
- 5.- Coonrod, JD. Pneumococcal pneumonia. *Sem Resp Infect*, 1989; 4: 4-11.
- 6.- Johanson, WG., Jr., Pierce, AK., Sandford, JP., Thomas, GD. Nosocomial respiratory infection with gram-negative bacilli: the significance of colonization of the respiratory tract. *Ann Intern Med*, 1972; 77: 701-706.
- 7.- Salavert, M., Gudin, J., Gobernado, M. Neumonía nosocomial: Etiopatogenia y tratamiento. *Crónica Antifecciosa*, 1995; 2: 4-5.
- 8.- Scheld, WM., Mandell, GL. Nosocomial pneumonia: Pathogenesis and recent advances in diagnosis and therapy. *Rev Infect Dis*, 1991; 13 (Suppl. 9): 743-751.
- 9.- Blackwood, LL., Stone, RM., Iglewsky, BH., Pennington, JE. Evaluation of *P. aeruginosa* exotoxin A and elastase as virulence factors in acute lung infection. *Infect Immun*, 1987; 39: 198-201.
- 10.- Nungester, WJ., Jourdanais, LF. Mucin as an aid in the experimental production of lobar pneumonia. *J Infect Dis*, 1936; 59: 258-265.
- 11.- Wood, WB., Jr. Studies on the mechanism of recovery in pneumococcal pneumonia I. The action of type-specific antibody upon the pulmonary lesions of experimental pneumonia. *J Exp Med*, 1941; 73: 201-222.
- 12.- Wood, WB., Jr., Irons, EN. Studies on the mechanism of recovery in pneumococcal pneumonia II. The effect of sulfonamide therapy upon the pulmonary lesion of experimental pneumonia. *J Exp Med*, 1946; 84: 365-375.
- 13.- Smith, MR., Wood, WB., Jr. An experimental analysis of the curative action of penicillin in acute bacterial infections II. The role of phagocytic cells in the process of recovery. *J Exp Med*, 1956; 193: 495-507.
- 14.- Bakker-Woundenberg, IAJM., Van den Berg, JC., Michel, MF. Therapeutic activities of cefazolin, cefotaxime, and ceftazidime against experimentally induced *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in rats. *Antimicrob Agents Chemother*, 1982; 22: 1042-1050.

- 15.- Roosendal, R., Bakker-Woundenberg, IAJM., Van den Berg, JC., Michel, MF. Therapeutic efficacy of continuous versus intermitent administration of ceftazidime in an experimental *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in rats. J Infect Dis, 1985; 152: 373-378.
- 16.- Roosendal, R., Bakker-Woundenberg, IAJM., Van den Berg, JC., Michel, M., Vink-van den Ber. Impact of the duration of infection on the activity of ceftazidime, gentamicin and ciprofloxacin in *Klebsiella pneumoniae* pneumonia and septicemia in leukopenic rats. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1991; 10: 1019-1025.
- 17.- Pennington, JE., Ehrie, MG. Pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia during immunosuppression. J Infect Dis, 1978; 137: 764-774.
- 18.- Winn, WC. Jr., Davis, GS. Experimental *Legionella* pneumonia as a model for the chemotherapy of facultative intracellular pathogens. En: Zak, O., Sande, MA. (Ed.) Experimental models in antimicrobial chemotherapy, Vol. II. Academic Press Inc., London, 1986; 297-319.
- 19.- Nishi, T., Tsuchiya, K. Experimental respiratory tract infection with *Klebsiella pneumoniae* DT-S in mice: chemotherapy with Kanamycin. Antimicrob Agents Chemother, 1980; 17: 494-505.
- 20.- Esposito, AL., Pennington, JE. Effects of aging on antibacterial mechanisms in experimental pneumonia. Am Rev Respir Dis, 1983; 128: 662-667.
- 21.- Esposito, AL., Pennington, JE. Experimental pneumonia due to *Haemophilus influenzae* observations on pathogenesis and treatment. J Infect Dis, 1984; 149: 728-734.
- 22.- Azoulay-Dupuis, E., Bedos, JP., Vallée, E., Hardy, DJ., Swanson, RN., Pocidalo, JJ. Antipneumococcal activity of ciprofloxacin in an experimental mouse pneumonia model at various stages of the disease. J Infect Dis, 1991; 163: 319-324.
- 23.- Azoulay-Dupuis, E., Bedos, JP., Vallée, E., Pocidalo, JJ. Comparative activity fluorinated quinolones in acute and subacute *Streptococcus pneumoniae* pneumonia models: efficacy of temafloxacin. J Antimicrob Chemother, 1991; 28 (Suppl. C): 45-53.
- 24.- Vallée, E., Azoulay-Dupuis, E., Swanson, RN., Bergogne-Berézein, E., Pocidalo, JJ. Individual and combined activities of clarithromycin and its 14-hydroxymetabolite in a murine model of *Haemophilus influenzae* infection. J Antimicrob Chemother, 1991; 27 (Suppl. A): 31-41.
- 25.- Weichselbaum, A. Ueber die aetiologie der acuten lungen und rippenfellentzündungen. Med Jahrbücher, 1886; 483-.
- 26.- Sternberg, GM. The etiology of croupous pneumonia. Natl Med Rev, 1897; 7: 175-177.

- 27.- Bracco, RM., Kraus, MR., Roe, AS., MacLeod, CM. Transformation reactions between pneumococcus and three strains of streptococci. *J Exp Med*, 1957; 106: 247-259.
- 28.- Austrian, R., Buettger, C., Dole, M. Problems in the classification and pathogenic role of alpha and non hemolytic streptococci of the human respiratory tract. En: Wannamaker, L.W., Matson, J.M. (Eds.). *Streptococci and streptococcal diseases*. Academic Press Inc, N.Y. 1972; 355-370.
- 29.- Deibel, RH., Seeley, HW., Jr. Family Streptococcaceae. En: *Bergey's manual of determinative bacteriology* (8^a ed.). Williams and Wilkins Company, Baltimore, M. 1986; 490-500.
- 30.- White, B. The biology of pneumococcus. The Commonwealth Fund., N.Y. 1938; 33-35.
- 31.- Neufeld, F. Ueber ein spezifische bakteriolytische wirkin der galle. *Z Hyg Infectionskr*, 1900; 34: 454-464.
- 32.- Bowers, EF., Jeffries, L.R. Optochin in the identification of *S. pneumoniae*. *J Clin Pathol*, 1955; 8: 58-60.
- 33.- Neufeld, F. Ueber die agglutination der pneumokokken und über die theorieen der agglutination. *Z Hyg Infectionskr*, 1902; 40: 54-72.
- 34.- Mosser, JL., Tomasz, A. Choline-containing teichoic acid as a structural component of pneumococcal cell wall and its role in sensitivity to lysis by an autolytic enzyme. *J Biol Chem*, 1970; 245: 287-292.
- 35.- Dhingra, RK., Williams, RC., Jr., Reed, WP. Effects of pneumococcal mucopolysaccharide and capsular polysaccharide on phagocytosis. *Infect Immun*, 1977; 15: 169-173.
- 36.- Wood, WB. Jr., Smith, MR. Host-parasite relationships in experimental pneumonia due to pneumococcus type III. *J Exp Med*, 1950; 92: 85.
- 37.- Lacks, S., Neuberger, M. Membrane location of a deoxyribonuclease implicated in the genetic transformation of *S. pneumoniae*. *J Bacteriol*, 1975; 124: 1321-1329.
- 38.- Horne, D., Plotch, S., Tomasz, A. Cell surface components implicated as attachment sites for the pneumococcal competence activator. En: Portoles, A. (Ed.). *Bacterial transformation and transfection: Proceedings of the 3rd european meetings on genetic transformation*. North Holland, Amsterdam 1974; 11-34.
- 39.- Williamson, R., Hakenbecky, R., Tomasz, A. The penicillin binding proteins of *S. pneumoniae* grown under lysis permissive and lysis protective (tolerant) conditions. *F.E.M.S. Microbial Letters*, 1980; 7: 127-131.
- 40.- Goebel, WF., Shedlovsky, T., Lavin, GI., Adams, MH. The heterophile antigen of pneumococcus. *J Biol Chem*, 1943; 148: 1-15.

- 41.- Briles, EB., Tomasz, A. Pneumococcal Forssman antigen, a choline-containing lipoteichoic acid. *J Biol Chem*, 1973; 248: 6394-6397.
- 42.- Fujiwara, M. The Forssman antigen of pneumococcus. *Japn J Exp Med*, 1967; 37: 581-592.
- 43.- Avery, OT., Morgan, HJ. Immunological reactions of the isolated carbohydrate and protein of pneumococcus. *J Exp Med*, 1925; 42: 347-53.
- 44.- Schiemann, O., Casper, W. Sind die spezifisch präcipitablen substanzen der 3 pneumolollentypen haptene?. *Zitsc Hyg Infectionskr*, 1927; 108: 220-257.
- 45.- Holtje, JV., Tomasz, A. Lipoteichoic acid: a specific inhibitor of autolysin activity in pneumococcus. *Proc Nat Acad Sci*, 1975; 72: 1690-1694.
- 46.- Kaplan, MH., Volanakis, JE.. Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system I. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with the choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin. *J Immunol*, 1974; 112: 2135-2147.
- 47.- Cleveland, RF., Holtje, JV., Wicken, AJ., Tomasz, A., Daneo-Moore, L., Shockman, GD. Inhibition of bacterial wall lysins by lipoteichoic acids and related compounds. *Biochem Biophys Res Comm*, 1975; 67: 1128-1135.
- 48.- Andersson, B. *et al.* Adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to human pharyngeal epithelial cells in vitro: differences in adhesive capacity among strains isolated from subjects with otitis media, septicemia or meningitis from healthy carriers. *Infect Immun*, 1981; 32: 311-317.
- 49.- Winkelstein, JA. The role of complement in the host's defense against *Streptococcus pneumoniae*. *Rev Infect Dis*, 1981; 3: 289-298.
- 50.- Horwitz, MA. Phagocytosis of microorganisms. *Rev Infect Dis*, 1982; 4: 104-123.
- 51.- Johnson, RB., Jr. The host response to invasion by *Streptococcus pneumoniae*: protection and the pathogenesis of tissue damage. *Rev Infect Dis*, 1981; 3: 282-288.
- 52.- Lund,E., Henrichsen, J. Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. En: *Methods in Microbiology*, Vol. 12. Norris and Ribbon, (Eds.). 1978; 242-261.
- 53.- Mckee, CM., Houck, CL. Induced resistance to penicillin of cultures of staphylococci, pneumococci and streptococci. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1943; 53: 33-34.
- 54.- Eriksen, KR. Studies on induced resistance to penicillin in a pneumococcus type 1. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 1945; 22: 398-401.
- 55.- Hansman, D., Bullen, MM. A resistant pneumococcus. *Lancet*, 1967; 2: 264-265.

- 56.- Hansman, D., Glasgow, H., Sturt, J., Devitt, L., Douglas, R. Increased resistance to penicillin of pneumococci isolated from man. *N Eng J Med*, 1971; 284: 175-177.
- 57.- Hansman, D., Devitt, L., Miles, H., Riley, I. Pneumococci relatively insensitive to penicillin in Australia and New Guinea. *Med J Aust*, 1974; 2: 353-356.
- 58.- Gratten, M., Naraqi, S., Hansman, D. High prevalence of penicillin-insensitive pneumococci in Port Moresby, Papua New Guinea. *Lancet*, 1980; 2: 192-195.
- 59.- Naraqi, S., Kirkpatrick, GP., Kabins, S. Relapsing pneumococcal meningitis. Isolation of an organism with decreased susceptibility to penicillin G. *J Pediatr*, 1974; 85: 671-673.
- 60.- Appelbaum, PC., Bhamjee, A., Scragg, JN., Hallett, AF., Bowen, AA., Cooper, R. *Streptococcus pneumoniae* resistant to penicillin and chloramphenicol. *Lancet*, 1977; 2: 995-997.
- 61.- Appelbaum, PC. World-wide development of antibiotic resistance in pneumococci. *Eur J Clin Microbiol*, 1987; 6: 367-377.
- 62.- Baquero, F., Martínez-Beltrán, J., Loza, E. A review of antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Europe. *J Antimicrob Chemother*, 1991; 28 (Suppl. C): 31-38.
- 63.- Liñares, J., Pallares, R., Alonso, T., Pérez, JL., Ayats, J., Gudiol, F., Viladrich, PF., Martín, R. Trends in antimicrobial resistance of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Bellvitge Hospital, Barcelona, Spain (1979-1990). *Clin Infect Dis*, 1992; 15: 99-105.
- 64.- Klugman, KP. Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin Microb Rev*, 1990; 3 (2): 171-96.
- 65.- Muñoz, R., Coffey, TJ., Daniels, M., Dowson, CG., Laible, G., Casal, J., Hakenbeck, R., Jacobs, M., Musser, JM., Spratt, BG., Tomasz, A. Intercontinental spread of a multiresistant clone of serotype 23F *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis*, 1991; 164: 302-6.
- 66.- Bryant, MC. Antibiotics and their laboratory control. 2^a ed.. Butterworths, London, 1972; 1.
- 67.- Baquero, F. Aspectos generales de los antibióticos antimicrobianos. En: Plan de formación en enfermedades infecciosas. Módulo III: Antimicrobianos. Ed. Médica Internacional, S. A., 1991, 11-40.
- 68.- Bryan, LE., Bedard, J. Impermeability to quinolones in gram-positive and gram-negative bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1991; 10: 232-239.
- 69.- Neu, HC. The emergence of bacterial resistance and its influence on empiric therapy. *Rev Infect Dis*, 1983; 5: 9-20.

- 70.- Neu, HC. Antibiotic inactivating enzymes and bacterial resistance. En: Antibiotics in Laboratory Medicine. Lorian, V. (Ed.). Williams and Wilkins, Baltimore 1980; 454-473.
- 71.- Smith, JT. The mode of action of 4-quinolones and possible mechanisms of resistance. J Antimicrob Chemother, 1986; 18 (Supp. D): 21-30.
- 72.- Fleming, A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium* with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. Brit J Exp Pathol, 1929; 10: 226.
- 73.- Chain, E., Florey, HW., Gardner, AD., Heatley, WG., Jennings, MA., Orr Ewings, J., Sanders, AG. Penicillin as a chemotherapeutic agent. Lancet, 1940; 239: 226-228.
- 74.- Florey, HW., Chain, E., Heatley, MG., Jennings, MA., Saunders, AG., Abraham, EP., Florey, ME. Antibiotics, Vol. 2. Oxford University Press, London, 1949.
- 75.- Dámaso, D., Moreno-López, M., Daza, RM. Betalactaminas I. Penicilinas. En: Dámaso, D., Moreno-López, M., Daza, RM. (Ed.) Antibióticos y quimioterápicos antibacterianos. Uso clínico. Grutesa, Madrid 1984; 119-168.
- 76.- Doyle, RJ., Chaloupka, J., Vinter, V. Turnover of cell walls in microorganisms. Microbiol Rev, 1988; 52: 554-567.
- 77.- Clauner, E., Holtje, JV., Schwartz, U. The composition of the murein of *Escherichia coli*. J Biol Chem, 1988; 263: 10088-10095.
- 78.- Bryan, LE., Godfrey, AJ. β -lactam antibiotics: mode of action and bacterial resistance. En: Antibiotics in laboratory medicine, 3^a ed. Lorian, V. (Ed.). Williams and Wilkins, Baltimore, 1991; 599-664.
- 79.- Rodríguez-Tebar, A., Rojo, F., Montilla, JC., Vázquez, D. FEMS. Microbiology Letters, 1982; 14: 295.
- 80.- Suzuki, H., Nishimura, Y., Hirota, Y. On the process of cellular division in *Escherichia coli*: a series of mutants of *E. coli* altered in the penicillin-binding proteins. Proc National Acad Sci (USA), 1978; 75: 664-668.
- 81.- Broome-Smith, JK., Spratt, BG. Deletion of penicillin-binding protein G gene of *Escherichia coli*. J Bacteriol, 1982; 152: 904-906.
- 82.- Tomasz, A. The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillin: how the betalactam antibiotics kill and lyse bacteria. Annu Rev Microbiol, 1979; 33: 113-137.
- 83.- Moellering, RC., Eliopoulos, G., Sentochnik, DE. The carbapenems: new broad spectrum β -lactam antibiotics. J Antimicrob Chemother, 1989; 24 (Supp. A): 1-8.
- 84.- Zimmermann, W., Rosselet, A. Function of the outer membrane of *Escherichia coli* as a permeability barrier to beta-lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother, 1977; 12: 368-372.

- 85.- Dang, PL., Gutmann, L., Quentin, C., Williamson, R., Collatz, E. Some properties of *Serratia marcescens*, *Salmonella paratyphi* A and *Enterobacter cloacae* with non-enzyme-dependent multiple resistance to β -lactam antibiotics, aminoglycosides and quinolones. *Rev Infect Dis*, 1988; 10: 899-904.
- 86.- Godfrey, AJ., Shahrabadi, MS., Bryan, LE. Distribution of porin and lipopolysaccharide antigens on a *Pseudomonas aeruginosa* permeability mutant. *Antimicrob Agents Chemother*, 1986; 30: 802-805.
- 87.- Sawai, T., Hiruma, R., Kawana, N., Kaneko, M., Taniyasu, F., Inami, A. Outer membrane permeation of β -lactam antibiotics in *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1982; 22: 585-592.
- 88.- Dougherty, TJ. Genetic analysis and penicillin-binding protein alterations in *Neisseria gonorrhoeae* with cromosomally mediated resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 1986; 30: 649-652.
- 89.- Philpot-Howard, J. Antibiotic resistance and *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother*, 1984; 13: 199-208.
- 90.- Hakenbeck, R., Ellerbrok, H., Briese, T., Handwerker, S., Tomasz, A. Penicillin-binding proteins 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.
- 91.- Neu, HC. Betalactamasas: Una perspectiva sobre la contribución de estas enzimas a la resistencia bacteriana. En: *Augmentin. Revisión microbiológica, farmacológica y clínica*. Laboratorios Beecham, S.A. (Eds.). Temis, S.A., Barcelona 1989; 3-18.
- 92.- Dyke, KGH. Beta-lactamases of *Staphylococcus aureus*. En: *Betalactamases*. Hamilton-Miller, JMT., Smith, JT., (Eds). Academic Press, London 1979; 291-310.
- 93.- Sykes, RH., Matthew, M. The β -lactamases of Gram-negative bacteria and their role in resistance to β -lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother*, 1976; 2: 115-117.
- 94.- Tomasz, A., Albino, A., Zaneti, E. Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system. *Nature*, 1970; 227: 138-140.
- 95.- Liu, CH., Tomasz, A. Penicillin tolerance in multiply drug-resistant natural isolates of *S. pneumoniae*. *J Infect Dis*, 1985; 152: 365-372.
- 96.- Brennan, RO., Durack, DT. Therapeutic significance of penicillin tolerance in experimental streptococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother*, 1983; 23: 273-277.
- 97.- Simon, C., Stille, W., Perea, EJ. Propiedades de los antimicrobianos betalactámicos. En: *Manual de terapéutica antimicrobiana*. Salvat, 1987; 61-112.

- 98.- Gruneberg, RN. Antibiotic sensitivities of urinary pathogens, 1971-8. *J Clin Pathol*, 1980; 33: 853-856.
- 99.- Hassam, AZ., Shaw, EJ., Shooter, RA., Caro, DB. Changes in antibiotic sensitivity in strains of *Staphylococcus aureus*, 1952-78. *Br Med J*, 1978; 2: 536-537.
- 100.- O'Brien, TF., Acar, JF., Medeiros, AA., Norton, RA., Goldstein, F., Kent, RL. International comparison of prevalence of resistance to antibiotics. *J Am Med Assoc*, 1978; 239: 1518-1523.
- 101.- Labia, R., Peduzzi, J. Kinetics of β -lactamase inhibition by clavulanic acid. *Biochem Biophys Acta*, 1978; S26: 572-579.
- 102.- Reading, C., Cole, M. Clavulanic acid: a β -lactamase-inhibiting β -lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1977; 11: 852-857.
- 103.- Hunter, PA., 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.
- 104.- Neu, HC., Fuk, P. Clavulanic acid, a novel inhibitor of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 1978; 14: 650-655.
- 105.- White, AR., Boon, RJ., Masters, PJ., Sutherland, R. Actividad antibacteriana de amoxicilina/ácido clavulánico (augmentine) *in vitro*. En: Augmentine. Revisión microbiológica, farmacológica y clínica. Laboratorios Beecham, S.A. (Eds.). Temis, S.A., Barcelona 1989; 3-18.
- 106.- Pechere, JC., Letarte, R., Guay, R. Inhibitory activity of clavulanic acid against 16 β -lactamases produced by Gram-negative bacteria. En: Current Chemotherapy and Infectious Disease, Vol.1. Nelson, JD., Grassi, C. (Eds.). American Society for Microbiology, Washington DC. 1980; 323-326.
- 107.- Griffin, KE., Sutherland, R. Comparative activities of amoxicillin, ampicillin and amoxicillin/clavulanic acid against *Enterobacteriaceae* producing class-1 cephalosporinases. En: Spitzzy, KH., Karrer, K. (Eds.). Proceedings of the 13th International Congress of Chemotherapy, Part. 97, 1983; 1-5.
- 108.- Leshner, GY., Froelich, FJ., Gruett, MD. Bailey, JH., Brundage RP. 1,8-Naphthyridine derivatives, a new class of chemotherapy agents. *J Med Chem*, 1962; 5: 1063-1067.
- 109.- Crump, B., Wise, R., Dent, J. Pharmacokinetics and tissue penetration of ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*, 1983; 24: 784-786.
- 110.- Smith, JT. Chemistry and mode of action of 4-quinolone agents. Arbeitstay der Sektion. Antimikrobielle Chemoterapie der Paul-Erlich-Gessellschaft für Chemoterapie e V, Munich 1983.

- 111.- Crumplin, GC. Aspects of chemistry in the development of the 4-quinolone antibacterial agents. *Rev Infect Dis*, 1988; 10: 2-9.
- 112.- Chu, DTW., Fernandes, PB. Structure-activity relationships of the fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother*, 1989; 34: 681-684.
- 113.- Wolfson, J.S., Hooper, D.C. Fluoroquinolone antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*, 1989; 2: 376-424.
- 114.- Honorato Pérez, J., Suárez-Ochoa, JR., Aranza Perea, JR. Farmacología clínica de las fluorquinolonas. *Medicine*, 1988; Nov (nº extraordinario): 41-47.
- 115.- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, H., Itoh, T., Tomizana, JI. Nalidixic acid and resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977; 74: 4772-4776.
- 116.- Sugino, A., Peebles CL., Kreucer, KN, Cozzarelli, NR. Mechanisms of action of nalidixic acid: purification of *Escherichia coli* nal A gene product and its relationship to DNAgyrase and another nicking-closing enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977; 74: 4761-4771.
- 117.- Fernandes, PB. Mode of action and *in vitro* and *in vivo* activities of fluorquinolones. *J Clin Pharmacol*, 1988; 28: 156-168.
- 118.- Hooper, DC., Wolfson, JS. *The quinolones: mode of action and bacterial resistance*. En: *Antibiotics in laboratory medicine*, 3ª ed. Lorian, V., (Ed.). Williams and Wilkins, Baltimore 1991; 665-690.
- 119.- Lewin, CS., Morrissey, I., Smith, JT. The mode of action of quinolones: the paradox inactivity of low and high concentrations and activity in the environment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1991; 10: 240-248.
- 120.- Yoshida, H., Nakamura, M., Bogaky, M., Itoh, T., Kojima, T. Haton, H., Nakamura, S. Mechanism of action of quinolones against *Escherichia coli* DNA-gyrase. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993; 37: 839-845.
- 121.- Towner, KJ. Bacterial genetics. En: Greenwood, D., Slack, R., Peurtherer, J. (Eds.). *Medical Microbiology*. Churchill Livingstone, 14th edition; 79-96.
- 122.- Cook, TM., Dietz, WH., Goss, WA. Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. IV: Effect on the stability of cellular constituents. *J Bacteriol*, 1966; 91: 774-779.
- 123.- Phillips, I., Culebras, E., Moreno, F., Baquero, F. Induction of the SOS response by new 4-quinolones. *J Antimicrob chemother*, 1987; 20: 631-638.

- 124.- Smith, JT., Lewin, CS. Química y mecanismo de acción de los antibacterianos quinolonas. En: Andriole, VT. (Ed.). *Las Quinolonas*. Academic Press Limited, London 1989; 25-90.
- 125.- Shen, LL., Pernet, A. Mechanism of inhibition of DNA gyrase by analogs of nalidixic acid: the target of the drug is DNA. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 1985; 82: 307-311.
- 126.- Shen, LL., Mitscher, LA., Sharma, PN., O'Donnell, TJ., Chu, DWT., Cooper, CS., Rosen, T., Pernet, AG. Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: a cooperative drug-DNA binding model. *Biochemistry*, 1989; 28: 3886-3894.
- 127.- Hirai, K., Aoyama, H., Iri Kura, T., Iyobe, S., Mitsunashi, S. Differences in susceptibility to quinolones of outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1986; 29: 535-538.
- 128.- Cohen, SP., Hooper, DC., Wolfson, JS., Souza, KS., McMurry, LM., Levy, SB. Endogenous activity efflux of norfloxacin in susceptible *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1988; 33: 239-241.
- 129.- Chapman, JS., Bertasso, A., Georgopapada Kou, NH. Fleroxacin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1989; 33: 239-241.
- 130.- Kotera, Y., Kato, T., Hirose, T., Iove, M., Mitusunashi, S. Mechanism of norfloxacin uptake into *Escherichia coli*. En: Abstract of the 15th International Congress of Chemotherapy. Istanbul, Turkey. International Society of Chemotherapy, 1987; Abstract n° 185.
- 131.- Diver, JM., Piddock, LJV., Wise, R. Investigation into the mechanism of cell death of *Escherichia coli* K12 after exposure to quinolone antibacterials. En: Abstract of the 15th International Congress of Chemotherapy. Istanbul, Turkey. International Society of Chemotherapy, 1987; Abstract n° 985.
- 132.- Diver, JM., Piddock, LJV., Wise, R. The accumulation of five quinolone antibacterial agents by *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*, 1990; 25: 319-333.
- 133.- Piddock, LJV. Leading article. *J Antimicrob Chemother*, 1991; 27: 339-403.
- 134.- Blaser, J., Dudley, MN., Gilbert, D., Zinner, SH. Influence of medium and method on the *in vitro* susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria to ciprofloxacin and enoxacin. *Antimicrob Agents Chemother*, 1986; 29: 927-929.
- 135.- Smith, JT., Ratchiff, NT. Einfluss von pH wert und magnesium auf die antibakterielle aktivitat von chinolo-preparaten. *Infection*, 1986; 14: 31-35.
- 136.- Barry, AL., Jones, RN., Thornsberry, C., Ayers, LW., Gerlach, EH., Sommers, HM. Antibacterial activities of ciprofloxacin, norfloxacin, oxolonic acid, cinoxacin and nalidixic acid. *Antimicrob Agents Chemother*, 1984; 25: 633-637.

- 137.- Barry, AL., Gardiner, RV., Packer, RR. Bactericidal activities of ten different fluorquinolones against selected *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1987; 6: 81-83.
- 138.- Barry, AL. *In vitro* activities of the quinolone antimicrobial agents. En: Quinolones. Fernandes, PB. (Ed.). Proceedings of an International Telesymposium. JR. Prous Science Publishers, Barcelona 1989; 237-254.
- 139.- Power, EGM., Muñoz Bellido, JL., Phillips, I. Detection of ciprofloxacin resistance in Gram negative bacteria due to alterations in *gyr A*. *J Antimicrob Chemother*, 1992; 29: 9-17.
- 140.- Gutmann, L., Williamson, R., Moreau, N., et al. Cross-resistance to nalidixic acid, trimethoprim and cloranphenicol associated with alterations in outer membrane proteins of *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Serratia*. *J Infect Dis*, 1985; 151: 501-507.
- 141.- Honorato, J., Suárez, JR., Azanza, JR. Farmacología clínica de las fluorquinolonas. *Medicine*, Nov (Nº. extra): 41-47.
- 142.- Wise, R., Lokley, R., Dent, J., et al. Pharmacokinetics and tissue penetration of enoxacin. *Antimicrob Agents Chemother*, 1984; 26: 17-19.
- 143.- Wise, R., Lokley, RM., Webberly, M., et al. Pharmacokinetics of intravenously administered ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*, 1984; 26: 208-210.
- 144.- Montay, G., Govellon, Y., Roquet, F. Absorption, distribution, metabolic fate and elimination of pefloxacin mesylate in mice, rats, dogs, monkeys and humans. *Antimicrob Agents Chemother*, 1984; 25: 463-472.
- 145.- Swanson, BN., Boppana UK., Vlasses, PH., et al. Norfloxacin disposition after sequentially increasing oral doses. *Antimicrob Agents Chemother*, 1983; 23: 284-288.
- 146.- Bergan, T. Pharmacokinetics of fluorinated quinolones. En: Andriole, VT. (Ed.). The quinolones. Academic Press, London 1988; 119-154.
- 147.- Gimarellou, H., Kolokythas, E., Petriokkos, G., et al. Pharmacokinetics of three newer quinolones in pregnant and lactating women. *Am J Med*, 1989; 87: 49-51.
- 148.- Norrby, SR. Side-effects of quinolones: comparisons between quinolones and other antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1991; 10: 378-383.
- 149.- Esposito, S., Galante, D., Barba, D., et al. Efficacy and safety of ciprofloxacin in the treatment of UTIs and RTIs in patients affected by liver diseases. *Infection*, 1988; 16 (Suppl. 1): 57-61.
- 150.- Thys, JP., Jacobs, F., Motte, S. Quinolones in the treatment of lower respiratory tract infections. *Rev Infect Dis*, 1989; 11 (Suppl. 5): 15-22.

- 151.- Lee, BC., Padula, AM., Kimbraugh, RC., Jones, SR., Chaisson, RE., Mills, J. Infectious complications with respiratory pathogens despite ciprofloxacin therapy. *N Engl J Med*, 1991; 325: 520-521.
- 152.- Campoli-Richards, DM., Monk, JP., Price, A., Benfield, P., Todd, PA., Ward, A. Ciprofloxacino: Una revisión de la actividad antibacteriana, propiedades farmacocinéticas y uso terapéutico. *Drugs*, 1988; 35: 373-447.
- 153.- Easmon, CSF., Crane, JP., Blowers, A. Effect of ciprofloxacin on intracellular organisms: *in vitro* and *in vivo* studies. *J Antimicrob Chemother*, 1986; 18 (Suppl. D): 43-48.
- 154.- García-Rodríguez, JA. Microbiología de ciprofloxacina. *Drugs of today*, 1988; 24 (Suppl. 8): 1-10.
- 155.- Bergan, T., Dalhoff, A., Rohwedder, R. Pharmacokinetics of ciprofloxacin. *Infection*, 1988; 16 (Suppl. 1): 3-13.
- 156.- D'Espine, M., Bellido, F., Pechére, JC. Serum levels of ciprofloxacin after single oral doses in patients with septicemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1989; 8: 1019-1023.
- 157.- Jones, RN., Barry, AL., Gavan, TL., Washington, JA. Susceptibility tests: microdilution and macrodilution broth procedures. En: Lennette, EH., Balows, A., Hausler, Jr., Shadomy, HJ. (Eds.). *Manual of clinical microbiology*, 4ª edic. American Society for Microbiology, Washington, 1985; 972-977.
- 158.- Stratton, CW., Cooksey, RC. Susceptibility tests: special tests. En: Lennette, EH., Balows, A., Hausler, Jr., Shadomy, HJ. (Eds.) *Manual of Clinical microbiology*, 4ª edic. American Society for Microbiology, Washington, 1985; 1153-1165.
- 159.- Craig, WA., Gudmundsson, S. The postantibiotic effect. En: *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 3ª ed. Lorian, V. (Ed.). Williams and Wilkins, Baltimore 1991; 403-431.
- 160.- Odenholt-Tornquist, I., Löwdin, E., Cars, O. Postantibiotic sub-MIC effects of vancomycin, roxithromycin, sparfloxacin and amikacin. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992; 36: 1852-1858.
- 161.- Mc. Donald, PJ., Craig, WA., Kunin, CM. Persistent effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* after exposure for limited periods of time. *J Infect Dis*, 1977; 135: 217-223.
- 162.- Azoulay-Dupuis, E., Vallee, B., Veber, B., Bedos JP., Bauchet, J., Pocardalo, JJ. *In vivo* efficacy of a new fluorquinolone, sparfloxacin, against penicillin-susceptible and -resistant and multiresistant strains of *Streptococcus pneumoniae* in a mouse model of pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992; 36: 2698-2703.

- 163.- Briles, DE., Crain, MS., Gray, BM., Forman, C., Yother, J. Strong association between capsular type and virulence for mice among human isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, 1992; 60: 111-116.
- 164.- Escande, MC., Povart-Sameron, C., Lagrande, PH. Effects of selected antibiotics on experimental candidiasis in cyclophosphamide treated mice: an *in vivo* model to evaluate relationship. En: Gillissen, G., Opferkuch, W., Peters, G., Pulverer, G. (Eds.). The influence of antibiotics on the host-parasite III. Springer-Vuerlag, Berlin Heidelberg, 1989; 184-195.
- 165.- Gerber, AU., Craig, WA., Brugger, HP., Feller, C., Vastila, AP., Brandel, J. Impact of dosing intervals on activity of gentamicin and ticarcillin against *Pseudomonas aeruginosa* in granulocytopenic mice. *J Infect Dis*, 1983; 147: 910-917.
- 166.- Cleeland, R., Squires, E. Evaluation of new antibiotics. En: *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 3ª ed. Lorian, V. (Ed.). Williams and Wilkins, Baltimore 1991; 739-786.
- 167.- Davis, CC. Mellencamp, MA., Preheim, LC. A model of pneumococcal pneumonia in chronically intoxicated rats. *J Infect Dis*, 1991; 163: 799-805.
- 168.- Reed, LJ., Muench, H. A simple method for estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg*, 1938; 27: 493-497.
- 169.- Grove, DC., Randall, WA. Assay methods of antibiotics: a laboratory manual (antibiotics monograph 2). Medical Encyclopedia, New York 1955.
- 170.- Renneberg, J., Walder, M. A mouse model for simultaneous pharmacokinetics and efficacy studies of antibiotics at sites of infection. *J Antimicrob Chemother*, 1988; 22: 51-60.
- 171.- Jackson, D., Cooper, DL., Horton, R., Langley, PF., Staniforth, DS., Sutton, AJ. Absorption, pharmacokinetic and metabolic studies with Augmentin. *Augmentin-Proceedings of the European Symposium*. Scheveningen, Holanda 1982; 83-101.
- 172.- Ilstrup, DM. Statistical methods in microbiology. *Clin Microbiol Rev*, 1990; 3: 219-226.
- 173.- Bouza, E. Infección neumocócica. patrones de susceptibilidad antibiótica en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 1993; 11: 15-22.
- 174.- Garau, J. Actividad de las cefalosporinas frente a *Streptococcus pneumoniae*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 1993; 11: 28-32.
- 175.- Liñares, J. Resistencia de *Streptococcus pneumoniae* a los antibióticos en España (1979-1994). *Crónica Antiinfecciosa*, 1995; 1: 4-6.
- 176.- Koornhof, HJ., Wasas, A., Klugman, KP. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: a South African perspective (abstract nº 309). En: *Program and Abstracts of the 5th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 1991; 56.

- 177.- Pallares, R. Pneumococcal antimicrobial resistance: the problem in Spain (abstract nº 311). En: Program and Abstracts of the 5th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 1991; 56.
- 178.- Maiton, A. Pneumococcal antimicrobial resistance: the problem in Hungary (abstract nº 312). En: Program and Abstracts of the 5th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 1991; 56.
- 179.- García-Leoni, M., Cercenado, E., Rodeño, P., Bernaldo de Quirós, JCL., Martínez-Hernández, D., Bouza, E. Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin: a prospective microbiological and clinical study. Clin Infect Dis, 1992; 14: 427-435.
- 180.- Pastor, A., Cantón, E., Gobernado, M. Efecto postantibiótico (EPA). I. Métodos de estudio y factores influyentes. Rev Esp Quimioterap, 1992; 5: 201-210.
- 181.- Georgopapadakou, NH., Kiu, FY. Penicillin-binding proteins in bacteria. Antimicrob Agents Chemother, 1980; 18: 148-157.
- 182.- Wilson, DA., Rolinson, GN. The recovery period following exposure bacteria to penicillins. Chemotherapy, 1979; 25: 14-22.
- 183.- Koch, AE., Burchall, JJ. Reveal of the antimicrobial activity of trimethoprim by thymidine in commercially prepared media. Appl Microbiol, 1971; 22: 812-817.
- 184.- Hessen, MT., Pitsakis, PG., Levison, ME. Absence of postantibiotic effect in experimental *Pseudomonas* endocarditis treated with imipenem, with or without gentamicin. J Infect Dis, 1988; 158: 542-548.
- 185.- Davidson, RJ., Zhanel, GG., Phillips, R., Hoban, DJ. Human serum enhances the postantibiotic effect of fluorquinolones against *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 1991; 35: 1261-1263.
- 186.- Neu, HC., Novelli, A., Chin, NX. Comparative *in vitro* activity of a new quinolone, AM-1091. Antimicrob Agents Chemother, 1989; 33: 1036-1041.
- 187.- Zhanel, GG., Karlowsky, JA., Davidson, RJ., Hoban, DJ. Effect of pooled human cerebrospinal fluid on the postantibiotic effects of cefotaxime, ciprofloxacin and gentamicin against *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother, 1992; 35: 1136-1139.
- 188.- Espinoza, AM., Chin, NX., Novelli, A., Neu, HC. Comparative *in vitro* activity of a new fluorinated 4-quinolone, T-3262 (A-60969). Antimicrob Agents Chemother, 1988; 32: 663-670.
- 189.- Gudmundsson, A., Erlendsdohir, H., Gottfredsson, M., Gudmundsson, S. Impact of pH and cationic supplementation on *in vitro* postantibiotic effect. Antimicrob Agents Chemother, 1991; 35: 2617-2624.

- 190.- Minguez, F., Ramos, C., Barrientos, S., Lurueña, S., Loscos, A. Influencia de diversos factores sobre el efecto postantibiótico y la actividad antimicrobiana de ciprofloxacino. *Rev Esp Quimioterap*, 1990; 3: 229-234.
- 191.- Feld, R., Valdivieso, M., Bodey, GP., Rodríguez, V. A comparative trial of sisomicin therapy by intermittent versus continuous infusion. *Am J Med Sci*, 1977; 274: 179-188.
- 192.- Bundtzen, RW., Gerber, AU., Cohn, DL., Craig, WA. Postantibiotic suppression of bacterial growth. *Rev Infect Dis*, 1981; 3: 28-37.
- 193.- Baquero, F., Culebras, E., Patrón, C., Pérez-Díaz, JC., Medrano, JC., Vicente, F. Postantibiotic effect of imipenem on gram positive and gram negative microorganisms. *J Antimicrob Chemother*, 1986; 18 (Suppl. E): 47-59.
- 194.- Corrado, ML., Landesman, SH., Cherubin, C. Influence of inoculum size on activity of cefoperazone, cefotaxime, moxalactam, piperacillin and N-formimidoyl, thienamycin (MKO787) against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1980; 18: 893-896.
- 195.- Eng, RH., Cherubin, C., Smith, SM., Buccini, F. Inoculum effect of β -lactam antibiotics on *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1985; 28: 601-606.
- 196.- Chapman, S., Sttiebigel, R. Staphylococcal β -lactamase and efficacy of β -lactam antibiotic *in vitro* and *in vivo* evaluation. *J Infect Dis*, 1981; 147: 1078-1089.
- 197.- Odenholt-Tornquist, I. Pharmacodynamics of betalactam antibiotics. Studies of the paradoxical and postantibiotic effects *in vitro* and in an animal model. *Scandinavian J Infect Dis*, 1989; 58: 1-55.
- 198.- Gerber, AU., Wiprächtiger, P., Stettler-Spichiger, U., Lebek, G. Constant infusions versus intermittent doses of gentamicin against *P. aeruginosa in vitro*. *J Infect Dis*, 1982; 145: 554-560.
- 199.- Gerber, AU., Craig, WA. Growth kinetics of respiratory pathogens after short exposures to ampicillin and erythromycin *in vitro*. *J Antimicrob Chemother*, 1981; 8: 581-591.
- 200.- Eagle, H., Fleishman, R., Musselman, AD. The effective concentrations of penicillin *in vitro* and *in vivo* for streptococci, pneumococci and *Treponema pallidum*. *J Bacteriol*, 1950; 59: 625-643.
- 201.- Tuomanen, E. Newly made enzymes determine ongoing cell wall synthesis and the antibacterial effects of cell wall synthesis inhibitors. *J Bacteriol*, 1986; 167: 535-543.
- 202.- Mackenzie, FM., Gould, JM. The postantibiotic effect. *J Antimicrob Chemother*, 1993; 32: 519-537.

- 203.- Eagle, H. The recovery of bacteria from the toxic effects of penicillin. *J Clin Invest*, 1949; 28: 832-836.
- 204.- Vogelman, BS. Craig, WA. Postantibiotic effects. *J Antimicrob Chemother*, 1985; 15 (Suppl. A): 37-46.
- 205.- Zhanel, GG., Hoban, DJ., Harding, GKM. The postantibiotic effect: a review of *in vitro* and *in vivo* data. *DICP, The Annals of Pharmacotherapy*, 1991; 25: 153-163.
- 206.- Bigger, JW. The bactericidal action of penicillin on *Staphylococcus pyogenes*. *Ir J Med Sci*, 1944; 227: 533-568.
- 207.- Chin, NX., Neu, HC. Postantibiotic suppressive effect of ciprofloxacin against gram-positive and gram-negative bacteria. *American J Med*, 1987; 82 (Suppl. 4A): 58-61.
- 208.- Bush, M., Boscia, JA., Wendeler, M., Pitsakis, PG., Kaye, D. *In vitro* postantibiotic effect of daptomycin (LY146032) against *Enterococcus faecalis* and methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother*, 1989; 33: 1198-1200.
- 209.- Fursted, K. Comparative killing activity and postantibiotic affect of streptomycin combined with ampicillin, ciprofloxacin, imipenem, piperacillin or vancomycin against strains of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium*. *Chemotherapy*, 1988; 34: 229-234.
- 210.- Kitzis, MD. Gutmann, L., Acar, JF. Recovery period after exposure of *Staphylococcus aureus* to subinhibitory and bactericidal concentrations of rifampicin: clinical implications. *J Antimicrobial Chemotherapy*, 1984; 13 (Suppl. C): 1-7.
- 211.- Sande, MA., Korzeniowski, OM., Allegro, GM., Brennan, RO., Zak, O., Scheld, WM. Intermittent or continuous therapy of experimental meningitis due to *Streptococcus pneumoniae* in rabbits: preliminary observations on the postantibiotic effect *in vivo*. *Rev Infect Dis*, 1981; 3: 98-109.
- 212.- Winstanley, FG., Hastings, JGM. Penicillin-aminoglycoside synergy and post-antibiotic effect for enterococci. *J Antimicrob Chemother*, 1989; 23: 189-199.
- 213.- Mc. Donald, PJ., Craig, WA., Kunin, CM. Brief antibiotic exposure and effect on bacterial growth. En: *Chemotherapy*, Vol. 2. Williams, JD., Geddes, AM. (Eds.). Plenum, New York 1976; 95-102.
- 214.- Gerber, AU., Bundtzen, RW., Craig, WA. Effect of dosing regimens on the activity of antimicrobial agents in an *in vivo* model. En: *Current Chemotherapy and Immunotherapy*. Periti, P., Grassi, GG. (Eds.). American Society for Microbiology, Washington D.C. 1982; 124-126.

- 215.- Parker, RF., Marsh, C. The action of penicillin on staphylococcus. *J Bacteriol*, 1946; 51: 181-186.
- 216.- Zhanel, GG., Davidson, RJ., Hoban, J. Reproducibility of the *in vitro* postantibiotic effect of fluorquinolones against *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*, 1990; 26: 724-726.
- 217.- Bodey, GP., Pan, T. Effect of cephalotin on growth patterns of microorganisms. *J Antibiot*, 1976; 29: 1092-1095.
- 218.- Odenholt, I., Holm, SE., Cars, O. An *in vivo* model for evaluation of the postantibiotic effect. *Scand J Infect Dis*, 1988; 20: 97-103.
- 219.- Eng, PHK., Smith, SM., Cherubin, CE., Tan, EN. Evaluation of two methods for overcoming the antibiotic carryover effect. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1991; 10: 34-38.
- 220.- Gould, IM., Jason, AC., Milve, K. Postantibiotic effect and bacterial killing by ciprofloxacin and imipenem alone and in combination. *Rev Infect Dis*, 1989; 11: 5957-5958.
- 221.- Hanberger, H., Nilsson, LE., Kihlstrom, E., Maller, R. Postantibiotic effect of β -lactam antibiotics on *E. coli* evaluated by bioluminescence assay of bacterial ATP. *Antimicrob Agents Chemother*, 1990; 34: 102-106.
- 222.- Isaksson, B., Nilsson, L., Maller, R., Sören, L. Postantibiotic effect of aminoglycoside on gram-negative bacteria evaluated by a new method. *J Antimicrob Chemother*, 1988; 22: 23-33.
- 223.- Bergan, T., Carlsen, IB., Fuglesang, JE. An *in vitro* model for monitoring bacterial responses to antibiotic agents under simulated *in vivo* conditions. *Infection*, 1980; 8: 96-102.
- 224.- Rescott, DL., Nix, DE., Holden, P., Schentag, JJ. Comparison of two methods for determining *in vitro* postantibiotic effects of three antibiotics on *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1988; 32: 450-453.
- 225.- Nadler, H., Pitkin, DH., Sheikh, W. The postantibiotic effect of meropenem and imipenem on selected bacteria. *J Antimicrob Chemother*, 1989; 24 (Suppl. A): 225-231.
- 226.- Lorian, V., Ernst, J., Amaral, L. The postantibiotic effect defined by bacterial morphology. *J Antimicrob Chemother*, 1989; 23: 485-491.
- 227.- Meng, X., Nightingale, CH., Sweeney, KR. Quantitation of *in vitro* postantibiotic effect based on the mean recovery time. I. Theoretical perspectives and a practical procedure. *J Antimicrob Chemother*, 1991; 28: 505-514.
- 228.- Domagk, G. Ein beitrag zur chemotherapie der bakteriellen infektionen. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 1935; 61: 250-253.

- 229.- Abraham, EP. Fleming's discovery. *Reviews of Infectious Diseases*, 1980; 2: 140-141.
- 230.- Council of Europe. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. *European Treaty Series*, N° 123. Council of Europe, Strasbourg 1986; 151.
- 231.- O'Grady, F. Animal models in the assessment of antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother*, 1976; 2: 1-3.
- 232.- Nishino, T., Zak, O. Systemic infection in mice: a first-time screening model in the evaluation of new antibiotics. En: Ishigami, I. (Ed.). *Recent Advances in Chemotherapy*. University of Tokyo Press, Tokyo 1985; 72-74.
- 233.- Zak O. Scope and limitations of experimental chemotherapy. *Experientia*, 1980; 36: 479-483.
- 234.- Zak, O., Sande, MA. Correlation of *in vitro* antimicrobial activity of antibiotics with results of treatment in experimental animal models and human infection. En: Sabath, LD. (Ed.). *Action of antibiotics in patients*. Hans Huber, Bern, Switzerland 1982; 55-67.
- 235.- Zak, O., Sande, MA. Introduction. The role of animal models in the evaluation of new antibiotics. En: Zak, O., Sande, MA. (Ed.) *Experimental models in antimicrobial chemotherapy*. Vol. 1. Academic Press Inc., London 1986; 1-5.
- 236.- Barza, M. A critique of animal models in antibiotic research. *Scandinavian J of Infectious Diseases*, 1978; 14, Suppl.: 109-117.
- 237.- Carbon, C. Significance of tissue levels for prediction of antibiotic efficacy and determination of dosage. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1990; 9: 510-516.
- 238.- Zak, O., O' Reilly, T. Animal models in the evaluation of antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother*, 1991; 35: 1527-1531.
- 239.- Wilson, R., Rayner, C. Animal models of respiratory infection. *J Antimicrob Chemother*, 1994; 33: 381-386.
- 240.- Pennington, JE. Animal models of pneumonia for evaluation of antimicrobial therapy. *J Antimicrob Chemother*, 1985; 16: 1-4.
- 241.- Kemmerich, B., Borner, K., Pennington, JE. Comparative evaluation of enoxacin, ofloxacin, ampicillin and chloramphenicol for treatment of experimental *Haemophilus influenzae* pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother*, 1987; 31: 417-420.
- 242.- Moine, P., Vallée, E., Azoulay-Dupuis, E., Bourget, P., Bédos, JP., Bauchet, J., Poccidalo, JJ. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994; 38: 1953-1958.
- 243.- Saffiotti, U., Cefis, F., Kolb, LH. A method for the experimental induction of bronchogenic carcinoma. *Cancer Res*, 1968; 28: 104-109.

- 244.- Zhang, L., Marcimo-Cabral, F., Bradley, SG. Effects of cyclophosphamide and a metabolite, acrolein, on *Naegleria fowleri* *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1988; 32: 962-965.
- 245.- Riedel, KD., Wildfeuer, A., Laufen, H., Zimmermann, T. Equivalence of a high-performance liquid chromatographic assay and a bioassay of azithromycin in human serum samples. *J Chromatogr*, 1992; 576: 358-362.
- 246.- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 5th international supplement. M-100-5S. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa 1994.
- 247.- Jacobs, MR., Bajaksouzian, S., Appelbaum, PC. Program Abstr. 31st Intersci. Conf. *Antimicrob Agents Chemother*, 1991; abstr. 193.
- 248.- Pankuch, GA., Jacobs, MR., Appelbaum, PC. Study of comparative antineumococcal activities of penicillin G, RP59500, erythromycin, sparfloxacin, ciprofloxacin, and vancomycin by using time-kill methodology. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994; 38: 2065-2072.
- 249.- Pankuch, GA., Visalli, MA., Jacobs, MR., Appelbaum, PC. Activities of oral and parenteral agents against penicillin-susceptible and -resistant pneumococci. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995; 39: 1499-1504.
- 250.- Visalli, A., Jacobs, MR., Appelbaum, PC. Activity of CP 99,219 (trovafloxacin) compared with ciprofloxacin, sparfloxacin, clinafloxacin, lomefloxacin and cefuroxime against ten penicillin-susceptible and penicillin-resistant pneumococci by time-kill methodology. *J Antimicrob Chemother*, 1996; 37: 77-84.
- 251.- Liñares, J., Tubau, F., Alcaide, F., Mariscal, D., Ardanuy, C., Martín, R. Actividad bactericida de cinco antibióticos β -lactámicos frente a *Streptococcus pneumoniae*. *Enf Inf Mic Clin*, 1993; 11 (Supl. 1): 23-27.
- 252.- De Nollin, S., Van Belle, H., Goosens, F., Thone, F., Borgers, M. Cytochemical and biochemical studies of yeast after *in vitro* exposure to miconazole. *Antimicrob Agents Chemother*, 1977; 1: 500-513.
- 253.- Bush, LM., Borcia, JA., Kaye, D. Daptomycin (LY 146032) treatment of experimental enterococci endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother*, 1988; 32: 877-881.
- 254.- Fuad, N., Frère, JM., Ghuysen, JM., Diez, C., Iwatsubo, M. Mode of interaction between beta-lactam antibiotics and the exocellular DD-carboxypeptidase-transpeptidase from *Streptomyces* R 39. *Biochemical J*, 1976; 155: 623-629.
- 255.- Fursted, K. Postantibiotic effect of ciprofloxacin on *P. aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol*, 1987; 6: 271-274.

- 256.- Gisby, J., Wightman, BJ., Beale, AS. Comparative efficacies of ciprofloxacin, amoxicillin, amoxicillin-clavulanic acid, and cefaclor against experimental *Streptococcus pneumoniae* respiratory infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 1991; 35: 831-836.
- 257.- Tateda, K., Takashima, K., Miyazaki, H., Matsumoto, T., Hatori, T., Yamaguchi, K. Noncompromised penicillin-resistant pneumococcal pneumonia CBA/J mouse model and comparative efficacies of antibiotics in this model. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996; 40: 1520-1525.
- 258.- Knudsen, JD., Frimodt-Moller, N., Espersen, F. Experimental *Streptococcus pneumoniae* infection in mice for studying correlation of *in vitro* and *in vivo* activities of penicillin against pneumococci with various susceptibilities to penicillin. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995; 39: 1253-1258.
- 259.- Schanker, LS. Physiological transport of drugs. *Advances in Drug Research*, 1964; 1: 71-106.
- 260.- Williams, RT. Interspecies variations in the metabolism of xenobiotics. *Biochemical Society Transactions*, 1974; 2: 359-77.
- 261.- Dedrick, RL., Bischoff, KB. Species similarities in pharmacokinetics. *Federation Proceedings*, 1984; 39: 54-59.
- 262.- Bosebaum, H. Interspecies scaling, allometry, physiological time and the ground plan of pharmacokinetics. *J Pharmacokinet Biopharm*, 1982; 10: 201-227.
- 263.- Dedrick, RL. Animal scale up. *J Pharmacokinet Biopharm*, 1973; 1: 435-461.
- 264.- Mordenti, J. Man versus beast: pharmacokinetic scaling in mammals. *J Pharm Sci*, 1986; 75: 1028-1040.
- 265.- Mizen, L., Woodnutt, G. A critique of animal pharmacokinetics. *J Antimicrob Chemother*, 1988; 21: 273-280.
- 266.- Adam, D., De Visser, I., Koeppe, P. Pharmacokinetics of amoxicillin and clavulanic acid administered alone and in combination. *Antimicrob Agents Chemother*, 1982; 22: 353-357.
- 267.- González, MA., Uribe, F., Moisen, SD., Fuster, AP., Selen, A., Welling, PG., Painter, B. Multiple-dose pharmacokinetics and safety of ciprofloxacin in normal volunteers. *Antimicrob Agents Chemother*, 1984; 26: 741-744.
- 268.- Levison, ME., Bush, LM. Pharmacodynamics of antimicrobial agents. Bactericidal and postantibiotic effects. *Infect Dis Clin North Am*, 1989; 3: 415-421.

- 269.- Benet, LZ., Mitchell, JR., Sheiner, LB. Farmacocinética: dinámica de la absorción, distribución y eliminación de los fármacos. En: Goodman y Gilman (Eds.). Las bases farmacológicas de la terapéutica, 8ª ed. Interamericana, S.A., México 1991; 1: 21-48.
- 270.- Mordenti, JJ., Quintiliani, R., Nightingale, CH. Combination antibiotic therapy: comparison of constant infusion and intermittent bolus dosing in an experimental animal model. *J Antimicrobial Chemother*, 1985; 15 (Suppl. A): 313-321.
- 271.- Vogelman, B., Gudmundsson, S., Leggett, J., Turnidge, J., Ebert, S., Craig, WA. Correlation of antimicrobial pharmacokinetic parameters with therapeutic efficacy in an animal model. *J Infect Dis*, 1988; 158: 831-847.
- 272.- Frimodt-Moller, N., Bentzon, MW., Thomsen, VF. Experimental infection with *Streptococcus pneumoniae* in mice: correlation of *in vitro* activity and pharmacokinetic parameters with *in vivo* effect for 14 cephalosporins. *J Infect Dis*, 1986; 154: 511-517.
- 273.- Barry, B., Muffat-Joly, M., Gehanno, P., Pocardalo, JJ. Effect of increased dosages of amoxicillin in treatment of experimental middle ear otitis due to penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993; 37: 1599-1603.
- 274.- Soriano, F., Ponte, C., Nieto, E., Parra, A. Correlation of *in vitro* activity and pharmacokinetic parameters with *in vivo* effect of amoxycillin, co-amoxiclav and cefotaxime in a murine model of pneumococcal pneumonia. *J Antimicrob Chemother*, 1996; 38: 227-236.
- 275.- Jacobs, MR. Treatment and diagnosis of infections caused by drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis*, 1992; 15: 119-127.
- 276.- Blaser, J., Stone, B., Goner, MC., *et al.* Comparative study with enoxacin and netilmicin in a pharmacodynamic model to determine the importance of ratio of antibiotic peak concentration to MIC for bactericidal activity and emergence of resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 1987; 31: 1054-1060.
- 277.- Crumplin, GC., Smith, JT. Nalidixic acid: an antibacterial paradox. *Antimicrob Agents Chemother*, 1975; 8: 251-261.
- 278.- Dudley, MN., Mandler, HD., Gilbert, D., Ericson, J., Mayer, KH., Zinner, SH. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin. *Am J Med*, 1987; 82 (Suppl. 4a): 363-368.
- 279.- Ebert, S., Redington, J., Rikardsdottir, S., *et al.* *In vivo* dose-response relationships for fleroxacin versus ciprofloxacin. Program Abstr 30th Intersc Conf Antimicrob Agents Chemother, 1990; abstr. 1003.

- 280.- Sullivan, MC., Cooper, BW., Nightingale, CH., Quintiliani, R., Lawlor, MT. Evaluation of the efficacy of ciprofloxacin against *Streptococcus pneumoniae* by using a mouse protection model. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993; 37: 234-239.
- 281.- Bakker-Woudenberg, IAJM., Roosendaal, R. Impact of dosage regimens on the efficacy of antibiotics in the immunocompromised host. *J Antimicrob Chemother*, 1988; 21: 145-147.
- 282.- Friedland, IR., Klugman, KP. Antibiotic-resistant pneumococcal disease in South Africa children. *American J of Diseases in Children*, 1992; 146: 920-923.
- 283.- Pallares, R., Liñares, J., Vadillo, M., Cabellos, C., Manresa, F., Viladrich, PF., *et al.* Resistance to penicillin and cephalosporins and mortality from severe pneumonia in Barcelona, Spain. *New England J of Medicine*, 1995; 333: 474-480.
- 284.- Feldman, C., Kallenbach, JM., Miller, SD., Thorburn, JR., Koornhof, HJ. Community-acquired pneumonia due to penicillin-resistant pneumococci. *New England J of Medicine*, 1985; 313: 615-617.
- 285.- Davis, RL., Rompalo, AM., Tartaglione, TA. Pneumonia caused by a relatively resistant strain of *Streptococcus pneumoniae*. *Clinical Pharmacy*, 1986; 5: 517-521.
- 286.- Sacho, H., Klugman, KP., Koornhof, HJ., Ruff, P. Community-acquired pneumonia in an adult due to a multiply resistant pneumococcus. *J of Infection*, 1987; 14: 188-189.
- 287.- Pallares, R., Guidol, F., Liñares, J., Ariza, J., Rufi, G., Murgui, L., *et al.* Risk factors and response to antibiotic therapy in adults with bacteremic pneumonia caused by penicillin-resistant pneumococci. *New England J Med*, 1987; 317: 18-22.
- 288.- Sánchez, C., Armengol, R., Mir, I., Lite, J., Garau, J. Neumococos resistentes a penicilina y uso empírico de penicilinas en el tratamiento de la neumonía aguda extrahospitalaria. *Enf Inf y Microbiol Clin*, 1992; 10: 334-339.
- 289.- Klugman, KP. Management of antibiotic-resistant pneumococcal infections. *J Antimicrob Chemother*, 1994; 34: 191-193.
- 290.- Klugman, KP. The clinical relevance of *in vitro* resistance to penicillin, ampicillin, amoxicillin and alternative agents, for the treatment of community-acquired pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*. *J Antimicrob Chemother*, 1996; 38 (Suppl. A): 133-140.
- 291.- Davies, BI., Maesey, FP., Baur, C. Ciprofloxacin in the treatment of acute exacerbations of chronic bronchitis. *Eur J Clin Microbiol*, 1986; 5: 226-231.
- 292.- Thys, JP. Quinolones in the treatment of bronchopulmonary infections. *Rev Infect Dis*, 1988; 10 (Suppl. 1): 212-217.

293.- Vellend, H. Role of fluorquinolones in lower respiratory tract infections. *Clin Invest Med*, 1989; 12: 39-43.

294.- Mouton, Y., Beuscart, C., Leroy O., Ajara, F., Charrel, J. Evaluation of ciprofloxacin versus amoxicillin+clavulanic acid or erythromycin for the empiric treatment of community-acquired pneumonia. *Pathol Biol*, 1991; 39: 34-37.

295.- Klein, NC. Fluorquinolones in respiratory infections. *Semin Respir Infect*, 1991; 6: 131-135.