

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología



**ESTUDIO DE LA ACCIÓN COMBINADA DE
ANTIBIÓTICOS [beta]-LACTÁMICOS Y SISTEMAS
INMUNOLÓGICO EN EL TRATAMIENTO DE LA SEPSIS
NEUMOCÓCICA EN UN MODELO EXPERIMENTAL
MURINO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

José Enrique Yuste Lobo

Bajo la dirección del Doctor:

Julio Casal Lombos

Madrid, 2002

ISBN: 84-669-2047-1

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA



ESTUDIO DE LA ACCIÓN COMBINADA DE
ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS Y SISTEMA
INMUNOLÓGICO EN EL TRATAMIENTO DE LA
SEPSIS NEUMOCÓCICA EN UN MODELO
EXPERIMENTAL MURINO

JOSÉ ENRIQUE YUSTE LOBO

Madrid, 2002



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Farmacia

Departamento de Microbiología

ESTUDIO DE LA ACCIÓN COMBINADA DE
ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS Y SISTEMA
INMUNOLÓGICO EN EL TRATAMIENTO DE LA SEPSIS
NEUMOCÓCICA EN UN MODELO EXPERIMENTAL
MURINO

Memoria que para optar al Grado de Doctor en

Farmacia, presenta:

José Enrique Yuste Lobo

Director de la Tesis:

Dr. Julio Casal Lombos

Laboratorio de Referencia de Neumococos

Centro Nacional de Microbiología

Instituto de Salud Carlos III

Madrid, 2002

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

$\Delta T > CMI$: tiempo en el que los niveles de antibiótico en suero exceden la CMI

A: amoxicilina

AMX: amoxicilina

Arg: arginina

AUC: área bajo la curva

BSA: albúmina sérica bovina

C_{max}: concentración máxima

CMB: concentración mínima bactericida

CMI: concentración mínima inhibitoria

cols: colaboradores

C-PS: polisacárido de la pared celular

CRP: proteína C reactiva de fase aguda

CTX: cefotaxima

CWPS: polisacárido de la pared celular

D.O: densidad óptica

DE₅₀: dosis eficaz en el 50% de los animales

DL₁₀₀: dosis letal que mata al 100% de los animales

DL₅₀: dosis letal que mata al 50% de los animales

DPS: dosis protectora de suero hiperinmune

Gal: galactosa

GalNAc: N-acetilgalactosamina

HBSS: sales equilibradas de Hank

His: histidina

IGIV: inmunoglobulina intravenosa

IL-1: interleukina 1

IL-6: interleukina 6

IL-8: interleukina 8
IP: intraperitoneal
Log: logaritmo
LTA: ácido lipoteicoico
mcg: microgramos
MDPA: mínima dosis protectora de antibiótico
min: minutos
PAF: factor de activación de plaquetas
PBPs: proteínas fijadoras de penicilina
Peni-R: resistente a penicilina
Peni-S: sensible a penicilina
PMNs: neutrófilos polimorfonucleares
PSC: polisacárido de la pared celular
PSs: polisacáridos
r.p.m.: revoluciones por minuto
rat: ratón
S: suero
ST: serotipo
TA: ácido teicoico
TH-Y: caldo Todd-Hewitt con extracto de levadura
TMB: 3,3', 5,5'- tetrametilbenzidina
Tween 20: sorbitano de monolaurato de polioxietileno
UFC/ml: unidades formadoras de colonias en un mililitro
X: cefotaxima

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 1 |
| 2. FACTORES DE VIRULENCIA..... | 2 |
| 2.1. Cápsula polisacárida..... | 5 |
| 2.2. Pared celular..... | 6 |
| 2.3. Proteínas..... | 7 |
| 2.3.1. Proteínas intracelulares..... | 7 |
| 2.3.2. Enzimas hidrolíticas..... | 8 |
| 2.3.3. Proteínas de superficie..... | 9 |
| 3. PATOGÉNESIS..... | 10 |
| 3.1. Colonización y adherencia..... | 10 |
| 3.2. Inflamación e invasión..... | 12 |
| 4. MECANISMOS DE DEFENSA..... | 14 |
| 4.1. Fagocitosis..... | 14 |
| 4.2. Respuesta humoral a los antígenos neumocócicos..... | 14 |
| 4.3. Predisposición genética..... | 16 |
| 5. IMPORTANCIA CLÍNICA DE <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 17 |
| 6. TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO..... | 19 |
| 6.1. β -lactámicos..... | 19 |
| 6.1.1. Estructura..... | 21 |
| 6.1.2. Mecanismo de acción..... | 21 |
| 6.1.3. Mecanismo de resistencia..... | 23 |
| 7. SUEROTERAPIA..... | 24 |
| 8. PREVENCIÓN DE LA INFECCIÓN PRODUCIDA POR <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 26 |
| 8.1. Vacunas constituidas por polisacárido capsular..... | 26 |
| 8.2. Vacunas conjugadas..... | 27 |

| | |
|---|----|
| OBJETIVOS | 29 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 30 |
| 1. ESTUDIO DE VIRULENCIA..... | 30 |
| 1.1. Animales de experimentación..... | 30 |
| 1.2. Selección de la cepa del estudio..... | 30 |
| 1.2.1. Conservación y cultivo de las cepas de <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 32 |
| 1.2.2. Dosis letal 50 (DL ₅₀) y Dosis letal 100 (DL ₁₀₀)..... | 32 |
| 2. SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS DEL ESTUDIO..... | 34 |
| 2.1. CMI y CMB..... | 34 |
| 2.2. Actividad bactericida | 34 |
| 3. SUEROTERAPIA..... | 36 |
| 3.1. Obtención del suero e inmunización..... | 36 |
| 3.2. Determinación de anticuerpos en el suero hiperinmune..... | 37 |
| 3.3. Opsonofagocitosis “in vitro”..... | 38 |
| 3.4. Protección por el suero en el modelo murino de sepsis neumocócica..... | 39 |
| 3.4.1. Suero no inmune..... | 39 |
| 3.4.2. Suero hiperinmune..... | 40 |
| 4. ANTIBIOTERAPIA..... | 41 |
| 4.1. Pruebas de protección por los antibióticos en el modelo murino de sepsis..... | 41 |
| 4.2. Niveles en el suero de ratón de la MDPA..... | 42 |
| 5. ESTUDIOS DE TERAPIA COMBINADA..... | 44 |
| 5.1. Pruebas de protección por la combinación de antibióticos con el suero hiperinmune en el modelo murino de sepsis..... | 44 |
| 5.2. Niveles en el suero de ratón de la MDPA obtenida en la combinación..... | 45 |

| | |
|---|-----------|
| 5.3. Terapia combinada conjunta..... | 45 |
| 6. PERFILES BACTERIÉMICOS..... | 46 |
| 6.1. Perfil de la cepa del estudio..... | 47 |
| 6.2. Perfil en presencia de suero hiperinmune..... | 47 |
| 6.3. Perfil en presencia de antibióticos..... | 47 |
| 6.4. Perfil con terapia combinada..... | 48 |
| 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 48 |
| 8. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO..... | 49 |
| | |
| IV. RESULTADOS..... | 51 |
| 1. ESTUDIO DE VIRULENCIA..... | 51 |
| 1.1. Selección de cepas virulentas..... | 51 |
| 1.2. Determinación de la DL ₅₀ y DL ₁₀₀ | 51 |
| 2. SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS DEL ESTUDIO DE LAS CEPAS DE NEUMOCOCO SELECCIONADAS..... | 52 |
| 2.1. CMI y CMB..... | 52 |
| 2.2. Actividad bactericida de los antibióticos del estudio..... | 53 |
| 3. SUERO HIPERINMUNE..... | 56 |
| 3.1. Determinación de anticuerpos en el suero hiperinmune..... | 56 |
| 3.2. Opsonofagocitosis “in vitro”..... | 56 |
| 3.3. Pruebas de protección..... | 59 |
| 3.3.1. Suero no inmune..... | 59 |
| 3.3.2. Suero hiperinmune (Determinación de la DPS)..... | 60 |
| 4. ANTIBIÓTICOS..... | 61 |
| 4.1. Pruebas de protección por los antibióticos en el modelo murino de sepsis..... | 61 |
| 4.2. Determinación de los niveles séricos de antibióticos correspondientes a la MDPA..... | 62 |
| 5. ESTUDIOS DE TERAPIA COMBINADA..... | 67 |

| | |
|--|------------|
| 5.1. Pruebas de protección por la combinación de antibióticos con el suero hiperinmune en el modelo murino de sepsis | 67 |
| 5.2. Niveles en el suero de ratón de la MDPA obtenida en la combinación..... | 69 |
| 5.3. Terapia combinada conjunta..... | 75 |
| 6. PERFILES BACTERIÉMICOS..... | 77 |
| 6.1. Perfil bacteriémico tras la inoculación de la cepa de neumococo 1515/97 ST 6B..... | 77 |
| 6.2. Perfil bacteriémico tras la administración de suero hiperinmune... | 79 |
| 6.3. Perfil bacteriémico de los animales tratados con los antibióticos β -lactámicos del estudio..... | 83 |
| 6.4. Perfil bacteriémico de la combinación DPS-MDPA..... | 87 |
| | |
| DISCUSIÓN..... | 92 |
| CONCLUSIONES..... | 113 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 115 |
| PUBLICACIONES | |

I. INTRODUCCIÓN

1. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae (neumococo) fue aislado por primera vez en 1881 en conejos inyectados con saliva humana (Sternberg GM). Inicialmente este “microorganismo septicémico de la saliva” fue denominado *Micrococcus pneumoniae* (Klein E, 1884) pero en 1901 Chester le aplicó su nombre definitivo de *Streptococcus pneumoniae*.

Neumococo es un patógeno exclusivamente humano que posee una morfología oval o esférica de entre 0,5 y 1,25 μm de diámetro, agrupándose preferentemente en parejas, aunque en ocasiones aparece aislado o formando cadenas cortas. Los extremos distales de los “diplos” adoptan una forma lanceolada. Los neumococos son microorganismos inmóviles y no forman esporas. En aislamiento primario, aparecen normalmente rodeados por una cápsula polisacáridica.

Otra característica de neumococo es la producción de un halo de α -hemólisis cuando se incuba en agar-sangre en condiciones aeróbicas debido a la producción de peróxido de hidrógeno (Barnard y Stinson, 1996). Una incubación anaerobia en el mismo medio produce β -hemólisis debido a la acción de la neumolisina (Brzin, 1969). Las colonias procedentes de cepas capsuladas son redondas, lisas, brillantes, convexas, transparentes y de tipo mucoso. A medida que las colonias van envejeciendo, se hunden en la zona central, debido a la autólisis, adquiriendo un aspecto umbilicado que permite diferenciarlas del resto de los estreptococos.

Desde el punto de vista metabólico, es un microorganismo microaerófilo y catalasa negativo encuadrándose dentro de las bacterias del ácido láctico. La identificación del neumococo se basa, asimismo, en su

sensibilidad a la optoquina (Fenoll y cols, 1994), en la reacción capsular frente a antiseros específicos o “Quellung” (Lund y Henrichsen, 1978) y en

su solubilidad en presencia de sales biliares debido a la acción de la principal autolisina de esta bacteria, lyt A (Mosser y Tomasz, 1970).

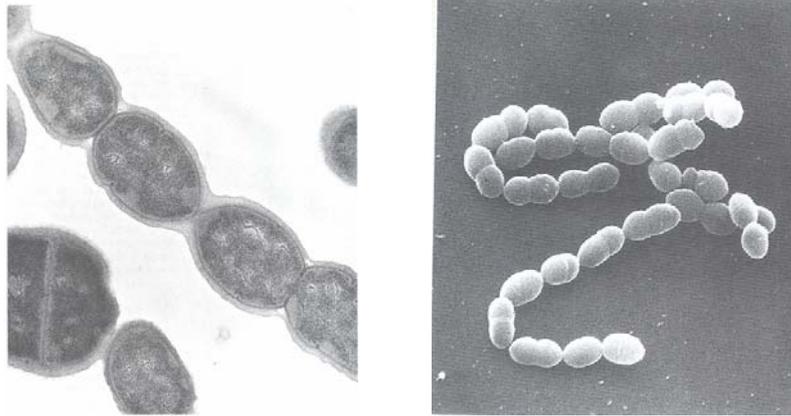


Figura 1: Microfotografía electrónica de *Streptococcus pneumoniae*.

2. FACTORES DE VIRULENCIA

El mecanismo por el cual el neumococo se traslada de la nasofaringe a los pulmones para causar neumonía, o a la sangre produciendo septicemia es, todavía, un proceso poco conocido (Johnston, 1991; Boulnois 1992, McCullers y Tuomanen, 2001). La mayoría de las infecciones ocurren probablemente después de la reciente adquisición de un serotipo nuevo y no después de un prolongado estado de portador (Gray y cols, 1980). Este hecho sugiere que tanto el estado inmune del huésped en el momento de la colonización como la virulencia de la cepa, determinarán si esa estirpe va a permanecer confinada en la nasofaringe o, por el contrario, será invasiva y

producirá enfermedad. La virulencia de neumococo ha sido atribuida a varios factores que están situados en la superficie bacteriana y que se resumen en la Tabla (1). La más externa de estas estructuras, la cápsula, es el principal factor de virulencia ya que protege al neumococo de las células fagocitarias de la sangre. Sin embargo la pared celular, la membrana plasmática y los antígenos somáticos (como la neumolisina) liberados como consecuencia de la acción indirecta del sistema autolítico de neumococo son los factores más importantes a nivel de patogénesis y respuesta inflamatoria frente a la infección (Tomasz, 1981).

TABLA1. Principales factores de virulencia de *Streptococcus pneumoniae*

| FACTOR DE VIRULENCIA | MECANISMO PROPUESTO |
|---|--|
| Cápsula | Falta de activación de la ruta alternativa del complemento Resistencia a la fagocitosis Deposición de componentes del complemento inactivos para la opsonización Nula o baja inmunogenicidad de algunos serotipos |
| Pared celular | Efecto inflamatorio <ul style="list-style-type: none"> ▪ Activación de la ruta alternativa del complemento con resultado de producción de anafilotoxinas ▪ Aumento de permeabilidad vascular, degranulación de mastocitos y activación de células polimorfonucleares ▪ Aumento de la producción de IL-1, efecto citopático en el endotelio Mediador en el ataque a células endoteliales |
| Neumolisina | Efecto citolítico a altas concentraciones Efecto citotóxico a bajas concentraciones <ul style="list-style-type: none"> ▪ Destrucción del epitelio e inhibición del movimiento ciliar ▪ Inhibición de la actividad bactericida de las células polimorfonucleares ▪ Inhibición de la proliferación de linfocitos ▪ Inhibición de la síntesis de anticuerpos Activación del complemento Aumento de monocitos y producción de IL-1 β y TNF- α Unión al fragmento Fc de los anticuerpos |
| PspA | Inhibición de la activación del complemento ^a |
| Componente del complemento de unión al factor H | Inhibición en la activación del complemento Inhibición de la fagocitosis |
| Lyt A | Liberación de la neumolisina y productos de la pared celular |
| Neuraminidasa ^b | Exposición de receptores para los neumococos ^a |
| Permeasas | Aumentan la adhesión |
| Peróxido de Hidrógeno | Daño pulmonar ^a |
| Proteasa IgA1 | Contrarresta los mecanismos de defensa de las mucosas ^a |

La mayoría de estos procesos se han observado sólo *in vitro*.

IL, interleuquina; TNF, factor de necrosis tumoral

^a Estos mecanismos han sido sugeridos pero no demostrados

^b Este mecanismo de virulencia ha sido demostrado sólo en neuraminidasas

virales

2.1. CÁPSULA POLISACARÍDICA

En 1925, Avery y colaboradores demostraron que la sustancia soluble que rodeaba a los neumococos estaba compuesta por polisacáridos (PSs). *S. pneumoniae* puede subdividirse en más de 90 serotipos diferentes en base a sus PSs capsulares (Henrichsen, 1995). El sistema de clasificación Americano ha sido reemplazado por el sistema Danés (Lund, 1970). Los PSs capsulares son polímeros de gran longitud de unidades repetidas lineales o ramificadas constituidas por 2 (serotipo 3, 37) a 8 (serotipo 17A) monosacáridos. Los distintos tipos de neumococo difieren significativamente en su virulencia. De los 90 serotipos conocidos actualmente, sólo un limitado número de 20 serotipos causan la mayoría (90%) de las enfermedades (Fenoll y cols, 1998). Aunque la cápsula polisacarídica no participa en los procesos de adherencia, invasión o inflamación en el hospedador (McCullers y Tuomanen, 2001), la cápsula favorece la virulencia al prevenir la fagocitosis mediada por complemento (Brown y cols, 1983) y proteger así a las estructuras internas de los neumococos (Nielsen y cols, 1993). Se ha sugerido que dependiendo de cómo se depositen los componentes de la cascada del complemento en los PSs capsulares, los serotipos de neumococo van a variar en su inmunogenicidad y resistencia a la fagocitosis. Algunas proteínas neumocócicas son capaces de degradar el componente C3 del complemento a iC3d (serotipo 3 y 4) o iC3b (serotipo 6A y 14) (Hostetter, 1986). IC3d es reconocido por los receptores de complemento CR2 de las células B pero no por los neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) (Griffioen y cols, 1991) mientras que iC3b se une a los PMNs vía CR3 pero no a las células B. (Gordon y cols, 1986). Esto podría explicar por qué los serotipos 3 y 4 que son inmunogénicos muestran resistencia a la fagocitosis mientras

que los serotipos 6A y 14 pobremente inmunogénicos son rápidamente ingeridos (Hostetter, 1986).

Las cepas no capsuladas también llamadas “rugosas” debido a la apariencia gruesa de sus colonias, no son virulentas al carecer del polisacárido protector externo (McCullers y Tuomanen, 2001).

2.2. PARED CELULAR

La superficie del neumococo está rodeada por una membrana plasmática, una pared celular y una cápsula. La pared celular se sitúa por debajo de la cápsula y consiste en una estructura dinámica compuesta por una triple capa de peptidoglicano en la que se alternan residuos de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico. La pared celular y la membrana plasmática forman un complejo formado por dos polímeros: ácido lipoteicoico (LTA) y ácidos teicoicos (TA). El LTA se une a la membrana mientras que el TA se une covalentemente al peptidoglicano de la pared celular vía residuos de N-acetilmuramil. Los TA neumocócicos son el principal constituyente del polisacárido de la pared celular (C-PS) mientras que el LTA es conocido como el antígeno F (Alonso de Velasco y cols, 1995). Estas estructuras son comunes para todos los serotipos (Sorensen y cols, 1998). Otros componentes de C-PS son N-acetilgalactosamina (Alonso de Velasco y cols, 1995) y la colina (Tomasz, 1967), siendo el último, un factor de crecimiento esencial para neumococo. Durante la fase estacionaria de crecimiento, el neumococo libera el antígeno F (reprime la autolisina) que se supone debe preceder a la lisis de la pared celular por la autolisina (Horne and Tomasz, 1985). Los polisacáridos (PSs) se unen covalentemente a estructuras de la pared celular (peptidoglicano) y posiblemente también a proteínas de la pared (Sorensen y cols, 1990).

La pared celular y las estructuras de carbohidratos asociadas, son importantes factores de virulencia. En contraste a los PSs capsulares, que son

relativamente no tóxicos, C-PS induce una fuerte respuesta inflamatoria. En ratones, C-PS imita la enfermedades neumocócicas como la otitis media (Carlsen y cols, 1992), meningitis (Tuomanen y cols, 1985) y neumonía (Tuomanen y cols, 1987). Además, C-PS puede inducir un síndrome gram-positivo de shock séptico. Estas reacciones están causadas por la activación de la vía alternativa del complemento que permite la liberación de las anafilotoxinas C3a y C5a. Como consecuencia de estos factores se producen una serie de alteraciones inflamatorias como, cambios en la permeabilidad vascular, degranulación de mastocitos y quimioatracción de los PMNs al lugar de la inflamación (Johnston, 1991). Existe un lejano debate sobre el potencial protector de los anticuerpos anti C-PS. Se acepta de forma generalizada que esos anticuerpos no protegen frente a la infección (Nielsen y cols, 1993).

2.3. PROTEINAS

Además de la cápsula polisacáridica de neumococo, ciertas proteínas neumocócicas juegan un importante papel en la patogénesis de la enfermedad, bien como mediadores de la inflamación o bien por ataque directo a los tejidos del huésped. La demostración de estas acciones se llevó a cabo induciendo proteínas mutadas de neumococo que mostraron una reducción paulatina de su virulencia en modelos de infección en ratones (Paton y cols, 1993). Varias proteínas neumocócicas relacionadas con virulencia como la PspA, PsaA, autolisina y la PspC (son proteínas de superficie) han sido estudiadas y analizadas. Además, los neumococos tienen varias enzimas hidrolíticas como neuraminidasa, hialuronidasa y proteasa IgA1. La proteína más ampliamente estudiada es la neumolisina que sin embargo es una proteína intracelular (Johnston, 1991).

2.3.1. PROTEÍNAS INTRACELULARES

La neumolisina es una citolisina tiol-activada producida por todos los aislados clínicos de *Streptococcus pneumoniae*. Como la neumolisina es una proteína intracelular, sus efectos sólo son evidentes después de la lisis de la bacteria. Ésta es mediada fundamentalmente aunque no exclusivamente por la autolisina neumocócica. Es extremadamente tóxica para los animales y probablemente también para los humanos. Esta acción puede ser debida en primer lugar a su afinidad por el colesterol de la membrana celular pudiendo llegar a formar poros en las células eucariotas. A concentraciones sub-líticas, la neumolisina puede modular la actividad de células de varios tejidos incluyendo las células ciliadas. Un segundo mecanismo de virulencia consiste en la activación de la vía clásica del complemento. Este mecanismo podría estar basado en la afinidad de la neumolisina por la parte constante de los anticuerpos IgG. Ambos mecanismos probablemente juegan un papel muy importante en la enfermedad neumocócica como indica el que un mutante negativo de neumolisina causó bacteriemia crónica antes que sepsis aguda en un modelo de infección en ratón (Benton y cols,1995).

2.3.2. ENZIMAS HIDROLÍTICOS

La mayoría de los aislados de neumococo producen los enzimas hidrolíticos neuraminidasa, hialuronidasa y proteasa IgA1. La neuraminidasa podría facilitar la colonización de los neumococos por adherirse en las células epiteliales a residuos de ácido siálico procedentes de las glicoproteínas, glicolípidos y oligosacáridos. La hialuronidasa podría contribuir a la capacidad invasiva de los neumococos mediante la degradación del componente ácido hialurónico de la matriz extracelular (Boulnois, 1992), mientras que la proteasa IgA1 podría interferir con el sistema de defensa inmune de la mucosa al hidrolizar IgA1 (Liu y cols, 1976).

2.3.3. PROTEÍNAS DE SUPERFICIE: PspA, PsaA, PspC y autolisina

Las proteínas neumocócicas PspA (proteína neumocócica de superficie) y PsaA (proteína neumocócica de adhesión a superficie) son factores de virulencia del neumococo (McDaniel y cols, 1987; Paton y cols, 1993). PspA y PsaA han sido detectadas en todas las cepas de este microorganismo. Al contrario de PsaA que es una proteína muy conservada, PspA es antigénicamente variable (Paton y cols, 1993). PspA muestra alta homología con la PspC (proteína neumocócica C de superficie) por su dominio de unión a colina y por su región rica en colina. PspC también conocida como SpsA (Hammerschmidt y cols, 1997) puede ser un importante factor de virulencia al unirse a la IgA. PspA puede inhibir el depósito de complemento C3 y la fagocitosis, mientras que los mecanismos de virulencia para PsaA pueden estar basados en su unión a células de la faringe. La autolisina o amidasa ácido-L-alanina N-acetilmurámico hidroliza el peptidoglicano a péptido y residuos de glicano, conduciendo a la lisis del neumococo y a la liberación de los componentes de la pared celular y de la neumolisina. Por lo tanto, la neumolisina y autolisina son factores de virulencia interdependientes, como fue demostrado con modelos de infección en ratón utilizando mutantes de autolisina o neumolisina (Paton y cols, 1993).

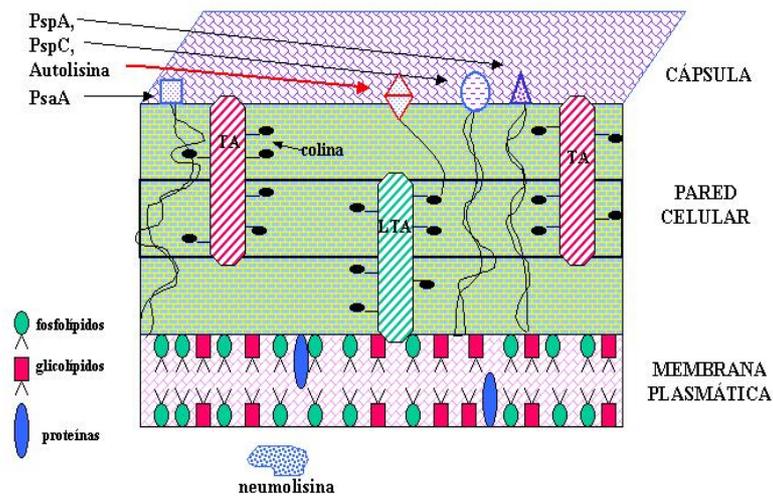


Figura 2: Estructura de *Streptococcus pneumoniae*.

3. PATOGÉNESIS

3.1. COLONIZACIÓN Y ADHERENCIA

Streptococcus pneumoniae es transportado en la nasofaringe por un porcentaje muy elevado de la población (Hendley y cols, 1975). En principio, todos los serotipos son capaces de colonizar la nasofaringe ya que los humanos son los únicos hospedadores conocidos. La adherencia de *S. pneumoniae* al tracto respiratorio es un proceso muy complejo en el que se expresan hasta 5 proteínas de superficie diferentes dependiendo del tipo de célula diana. El primer paso consistente en la unión al tracto respiratorio

superior, es una situación de tipo multi-receptor en la que las adhesinas de superficie del neumococo se fijan a los carbohidratos eucariotas de forma semejante a como la hacen las lectinas (Tuomanen y Masure, 1997). Los neumococos prefieren azúcares siálicos para su adherencia, GalNAc β 1 \rightarrow 4Gal (Krivan y cols, 1988). Este disacárido ha sido identificado en diferentes localizaciones del cuerpo humano; células epiteliales (Anderson y cols, 1983), nasofaringe (Novak y Tuomanen, 1999) y en el tejido pulmonar humano (Boulnois, 1992). Se ha sugerido que la neuraminidasa de *S. pneumoniae* actúa uniéndose al ácido siálico terminal de los receptores situados en los tejidos superficiales, mejorando así, la adherencia. Algunos virus con actividad neuraminidasa, como el *virus influenza* y *virus parainfluenza*, pueden actuar de forma sinérgica con los neumococos, en este sentido.

La capacidad de adherencia del neumococo difiere entre dos fenotipos morfológicos (en función de su aspecto en agar sólido): neumococo opaco y neumococo transparente (Weiser y cols, 1994). Las variantes transparentes son capaces de colonizar la nasofaringe de forma más eficiente y estable, mientras que las variantes opacas tienen una mayor virulencia y sobreviven mejor en sangre debido a diferencias en las proteínas de la pared celular (Kim y Weiser, 1998). Se ha sugerido que el fenotipo transparente es el que interviene en la colonización y como consecuencia de algún tipo de variación espontánea pasaría al fenotipo opaco produciéndose la invasión al torrente sanguíneo. *S. pneumoniae* expresa diferentes ligandos en su pared celular para adherirse, incluyendo algunas proteínas de unión a colina recientemente descritas. CbpA es una proteína multifuncional que participa en la unión al tracto respiratorio superior e inferior (Rosenow y cols, 1997). CbpD y CpbE también contribuyen a la colonización pero su papel es aún desconocido. CbpG es una proteasa que también contribuye a la colonización quizás por alterar o liberar otras moléculas de superficie que mejoren la interacción con el ligando celular. (Gosink y cols, 2000).

3.2. INFLAMACIÓN E INVASIÓN

El mecanismo por el cual el neumococo se traslada de la nasofaringe a los pulmones para causar neumonía, o a la sangre produciendo septicemia es, todavía, un proceso poco conocido. También puede ocurrir la invasión directamente desde la nasofaringe al torrente sanguíneo. (McCullers y Tuomanen, 2001).

Aunque *S. pneumoniae* puede unirse a una gran variedad de tipos de células epiteliales en la nasofaringe, no puede adherirse al epitelio ciliado del árbol traqueo-bronquial lo que dificulta el acceso a los alvéolos pulmonares. Este inconveniente puede explicar parcialmente la baja incidencia de neumonía comparada con el elevado estado de portador en la nasofaringe. Una vez que neumococo accede a los alvéolos puede utilizar diferentes receptores. El ligando que participa en el tracto respiratorio inferior es la CbpA que se une a los receptores del factor de activación de plaquetas (PAF) y de este modo se adhiere el neumococo a los neumocitos y células endoteliales. Neumococo reconoce al menos dos estructuras diferentes tanto en el epitelio pulmonar no inflamado como en el endotelio vascular: GalNAc ($\beta 1 \rightarrow 4$)Gal y GalNAc ($\beta 1 \rightarrow 3$)Gal (Cundell y Tuomanen, 1994). El papel que juegan estas interacciones está siendo ampliamente estudiado en la actualidad.

La adherencia, invasión y muerte de los neumococos en el tracto respiratorio inferior pueden contribuir a la inflamación mediante activación de citoquinas, complemento y la cascada de la coagulación. El primer estimulante inflamatorio es la pared celular, mientras que la cápsula polisacáridica es poco reactiva. El peptidoglicano se une a los receptores de superficie CD14 iniciándose la respuesta inflamatoria a endotoxina y el

receptor de tipo 2 inicia la cascada de citoquinas (TNF, IL-1, IL-6, IL-8). Esta situación produce alteraciones patológicas como engrosamiento pulmonar y hepatización roja.

La presencia de componentes de la pared celular (ácido teicóico y peptidoglicano) activan directamente la vía alternativa del complemento que induce la señal quimiotáctica para la acumulación de leucocitos. La llegada masiva de leucocitos y la insuficiente opsonización del neumococo por el complemento, que hace que no se elimine eficientemente del pulmón, provoca un cambio en la patogenia de modo que se pasa de una situación de hepatización roja a hepatización gris (McCullers y Tuomanen, 2001). *S. pneumoniae* ha desarrollado estrategias para disminuir los efectos del complemento bien uniéndose al componente C3 o degradándolo. La reducción de la inflamación y la resolución de la neumonía es dependiente de la aparición de los anticuerpos anti-capsulares. Estos anticuerpos permiten una eficiente opsonización facilitando la fagocitosis y pasando de este modo, de un estado patogénico de hepatización gris a la curación final. *S. pneumoniae* puede contrarrestar la opsonización por anticuerpos mediante la unión específica de la CbpA a la IgA. Además neumococo puede producir una proteasa de IgA. La inducción de inflamación parece ser un requisito previo para la invasión del epitelio respiratorio y de las células del endotelio vascular. El neumococo se une al receptor PAF mediante fosforilcolina. El proceso de invasión tiene lugar por transcitosis en vacuolas. Aproximadamente el 70% de la bacteria se interna por esta vía. (Tuomanen y Masure, 1997).

4. MECANISMO DE DEFENSA

4.1. FAGOCITOSIS

La eliminación del neumococo ocurre principalmente vía fagocitosis por neutrófilos (PMNs). La fagocitosis puede estar promovida por varios mecanismos. En primer lugar, en ausencia de anticuerpos, la proteína C-reactiva de fase aguda (CRP) puede unirse a lugares fosforilados del neumococo seguida por activación del complemento. Alternativamente, lectinas presentes en los fagocitos pueden reconocer ciertas estructuras de carbohidratos de la pared celular de los neumococos. Estos mecanismos, sin embargo, dependen de la cantidad y la estructura del PS capsular presente en el neumococo ya que al recubrir a las moléculas sub-capsuladas impiden el depósito de complemento (Gillespie, 1989). Los neumococos son más eficientemente eliminados por la fagocitosis mediada por anticuerpos antipolisacárido específicos y complemento. De todo el componente C3 del complemento que se deposita en el neumococo opsonizado, un 30% no se fija a la superficie sino que lo hace a la inmunoglobulina formando un complejo C3b/IgG. Este complejo tiene nuevas propiedades que difieren de las de la IgG o del C3b por sí solas ya que el complejo puede interactuar con los dos receptores en los fagocitos: Cr1, que reconoce C3b y FcR, que reconoce el fragmento Fc de IgG. Los neumococos opsonizados con IgG/C3b interactúan con ambos receptores y son fagocitados más rápidamente (Frank y cols, 1992).

4.2. RESPUESTA HUMORAL A LOS ANTÍGENOS NEUMOCÓCICOS.

Tan sólo los anticuerpos frente al PS capsular han sido descritos como protectores en humanos frente a enfermedad invasiva neumocócica.

Sin embargo, los PS son antígenos timo independiente, lo que significa que la respuesta inmunitaria no está mediada por las células T-Helper (Stein, 1992). Como consecuencia de ello, la respuesta de anticuerpos está principalmente restringida a IgM e IgA, el incremento de la afinidad por maduración no ocurre y la respuesta de la memoria en las células B no se produce (Stein, 1992). Las células B son activadas por reacción cruzada del antígeno PS y los receptores de IgM en las células B (BCR) debido a la naturaleza repetitiva de los epítomos PS. El depósito del complemento C3d en el PS actúa como una señal coestimuladora vía receptor CR2 de las células B. En niños menores de 2 años, la expresión del CR2 es baja. Como consecuencia, la activación de las células B por los antígenos PS a través de la ocupación de CR2 y reacción cruzada de las IgM es baja o ausente. Este mecanismo podría explicar en parte por qué los niños responden mal a los antígenos PS (Griffioen y cols, 1991-1993).

Por otro lado están las proteínas, que son antígenos timo-dependientes. Los antígenos proteicos al interactuar con las células B inducen anticuerpos capaces de activar las células de la memoria, aunque este fenómeno ocurre sólo después de la interacción con células T-Helper y sucesos mediados por citoquinas. Los antígenos timo dependientes son inmunogénicos en niños permitiendo que se cree memoria inmunológica, cambios de subclases de anticuerpos y afinidad por maduración (Noelle y Snow, 1991). Aprovechando estas características, las vacunas frente a neumococo que se han diseñado más recientemente y que van dirigidas a los niños, combinan los polisacáridos y las proteínas (vacunas conjugadas). Dependiendo de la edad y del tipo de antígeno, los subtipos de anticuerpos IgG varían en el rango IgG1:IgG2. En adultos, IgG2 es el subtipo dominante en respuesta al antígeno PS, mientras que las proteínas antigénicas dirigen la respuesta de anticuerpos hacia IgG1 (Alonso de Velasco y cols,1995). En niños, sin embargo, la respuesta de anticuerpos es principalmente de tipo IgG1 (Freijd y cols, 1984).

4.3. PREDISPOSICIÓN GENÉTICA: PAPEL DEL POLIMORFISMO DEL RECEPTOR $Fc\ \gamma$ -.

Añadiéndose a las diferencias encontradas en la edad y el antígeno, pequeñas diferencias en el fondo genético del hospedador pueden afectar a las respuestas anti PS y a la fagocitosis. En primer lugar, teniendo en cuenta que la respuesta a los antígenos PS son oligoclonales (Lucas y cols, 1997; Park y cols, 1996) ciertas particularidades podrían disminuir la variedad de anticuerpos (Musher y cols, 1997; Musher y cols, 1998; Rijkers y cols, 1993). En segundo lugar, los polimorfismos genéticos en los PMNs pueden afectar a la fagocitosis. Los PMNs expresan dos receptores para el dominio Fc de la IgG: Fc γ RIIa y Fc γ RIIIb. Estudios de inhibición con anticuerpos monoclonales específicos para Fc γ R mostraron que Fc γ RIIa es más eficiente estimulador de la fagocitosis que Fc γ RIIIb (Noya y cols, 1993).

Ambos receptores muestran polimorfismos genéticos. Los genotipos más importantes son los Fc γ RIIa 131Arg (Arginina) frente al alotipo His (Histidina) y el Fc γ RIIIb NA1 frente al alotipo NA2. Dependiendo del alotipo, la capacidad fagocítica puede variar ya que la afinidad por las inmunoglobulinas es diferente (Haagen y cols, 1995, Salmon y cols, 1995 y Van der Pol y cols, 1998).

Estos polimorfismos Fc γ R han sido identificados como factores de riesgo para susceptibilidad a infecciones con bacteria encapsulada. Hay una correlación entre frecuencia de Fc γ RIIa-R131 e incidencia y severidad de la enfermedad neumocócica y meningocócica (De Haas y cols, 1995; Huizinga y cols, 1991; Platonov y cols, 1998; Sanders y cols, 1994; Van der Pol y cols, 1998).

5. IMPORTANCIA CLÍNICA DE *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae es un patógeno típicamente humano que se localiza como comensal en la nasofaringe en al menos el 40% de la población general (Hendley y cols, 1975). Otros autores consideran que alrededor del 60% de la población mundial es portadora de este microorganismo y, estadísticamente hablando, todo individuo ha estado colonizado por neumococo alguna vez en su vida (Austrian, 1986). La colonización comienza después del nacimiento y hasta cuatro serotipos pueden estar colonizando simultáneamente. Sin embargo solamente un pequeño porcentaje de población colonizada desarrolla enfermedad neumocócica. El principal grupo de riesgo de enfermedad por neumococo son los niños por debajo de 2 años y los adultos por encima de 60 años de edad (Rijkers y cols, 1993). Otro grupo de riesgo son los individuos inmunocomprometidos que posean una deficiencia inmune primaria (genética) (Bruyn y cols, 1992; Gillespie, 1989; Johnston, 1991) o secundaria (adquirida). El último grupo incluye a los pacientes esplenectomizados (Aaberge y cols, 1996; Braconier y cols, 1984; Reinert y cols, 1994; Shatz y cols, 1998), alcohólicos (Jareo y cols, 1995; McMahon y cols, 1993) y pacientes con SIDA (Rijkers y cols, 1993). En niños, los neumococos son la segunda causa más común de meningitis bacteriana (Dagan y cols 1994) y la principal causa de otitis media (Klein, 1994; Leowski, 1986; Musher, 1992). En el mundo mueren aproximadamente un millón de niños por neumonía neumocócica (Sniadack y cols 1995). En adultos, *S. pneumoniae* es el patógeno más frecuentemente

asociado con neumonía comunitaria y se sitúa detrás de *N. meningitidis* como la segunda causa de meningitis bacteriana (Gillespie, 1989).

De los 90 serotipos conocidos actualmente, sólo un limitado número de 20 serotipos causan la mayoría (90%) de las enfermedades (Fenoll y cols, 1998). Los serotipos más frecuentemente aislados de pacientes incluyen al 1 y 4 procedente de sangre, al 6, 10 y 23 procedentes de líquido cefalorraquídeo y al 3, 19 y 23 procedente del oído medio de niños (Fenoll y cols, 1998). A los serotipos 6, 9V, 14, 19 y 23 se les conoce como serotipos pediátricos (Alonso de Velasco y cols, 1995, Fenoll y cols 2000). Estos serotipos son pobremente inmunogénicos y ésta podría ser la razón de su prevalencia en niños. La distribución de los serotipos varía no sólo con la edad sino también geográficamente (Bruyn y cols, 1992; Lee 1987). De hecho la distribución de serotipos es un proceso dinámico debido a difusión clonal (Appelbaum, 1992; Parkinson y cols, 1994; Yagupsky y cols, 1998), a la emergencia de nuevos serotipos (Henrichsen, 1995) y al intercambio de cápsula entre neumococos (Claverys y cols, 2000).

A pesar del rápido y amplio uso de antibióticos, la mortalidad y morbilidad de la enfermedad neumocócica continua siendo elevada (Gillespie y cols, 1995). Además, los neumococos resistentes a los antibióticos continúan aumentando en muchas zonas del mundo (Breiman y cols, 1994; Hofmann y cols, 1995; Magnus y cols, 1995). Las primeras cepas con susceptibilidad disminuida a penicilina fueron detectadas en los años 60 (Kislak y cols, 1965; Hansman y Bullen, 1967), a partir de entonces su número ha ido aumentando progresivamente y se han extendido por todo el mundo, aunque su incidencia varía de unas zonas a otras (Klugman, 1990; Dowson y cols, 1994). España es uno de los países donde se detectaron por primera vez cepas resistentes a penicilina (Casal, 1982). Datos publicados sobre el período comprendido entre 1979-1989 muestran que el porcentaje de resistencia a los antibióticos aumentó en España de forma alarmante durante esa década, pasando del 6% de resistencia a penicilina a finales de

los años 70 al 44% en tan sólo 10 años (Fenoll y cols, 1991). Actualmente la tasa global de resistencia a penicilina en nuestro país es de casi el 50%, aunque los neumococos con alto nivel de resistencia y por tanto son los que podrían producir resistencia clínica, representan tan sólo el 10%. A pesar de que la resistencia a penicilina parece estabilizada en los últimos años; la resistencia a otros antibióticos como la eritromicina sigue aumentando paulatinamente. Además, alrededor del 60% de las cepas son resistentes a uno o más agentes antimicrobianos y se ha pasado del 9,5% de cepas multiresistentes aisladas en 1990 al 16,6% en 1996. Durante este período se estudiaron 9.243 cepas de neumococo y ninguna de ellas mostró susceptibilidad disminuida a la vancomicina (Fenoll y cols, 1998). Recientemente, un artículo describiendo tolerancia a la vancomicina en neumococo ha alarmado a la comunidad científica (Novak y cols, 1999).

6. TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO

6.1. ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

Bajo esta denominación se agrupa un número continuamente creciente de antibióticos cuyo origen se remonta a 1928 cuando Fleming descubrió que un hongo del género *Penicillium* producía una sustancia, posteriormente denominada penicilina por él mismo, capaz de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. La familia de las cefalosporinas se inició en 1948 cuando Brotzu obtuvo a partir del hongo *Cephalosporium acremonium*, material activo frente a *S. aureus*. Actualmente, penicilinas y cefalosporinas forman el grupo de antibióticos más amplio en número y de mayor importancia en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. La importancia de estos antimicrobianos en la terapéutica antiinfecciosa, sin duda los antibióticos más usados en clínica, se debe a los siguientes factores:

- a) Su potente acción antibacteriana, de carácter bactericida.

- b) El amplio espectro alcanzado por muchos derivados.
- c) La existencia de preparados que resisten la inactivación enzimática inducida por las bacterias, y de inhibidores enzimáticos con o sin actividad antibacteriana propia.
- d) La presencia de características farmacocinéticas favorables: absorción oral, buena difusión tisular y aumento muy notable de la semivida logrado con algunos derivados.
- e) La producción de escasos efectos adversos.

El tratamiento empírico de las infecciones respiratorias adquiridas en la comunidad se basa en el uso de tres grupos de antibióticos: agentes β -lactámicos, macrólidos y fluoroquinolonas. Cuando se quiere evaluar la eficacia terapéutica de esos agentes antimicrobianos es necesario incluir en consideración los factores farmacocinéticos / farmacodinámicos (PK/PD).

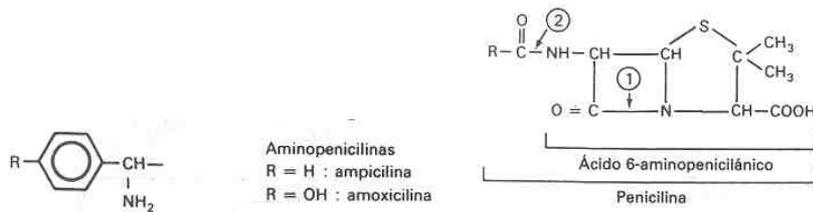
Dentro de los agentes β -lactámicos, las penicilinas más activas frente a cepas Peni-S de *S. pneumoniae* son la ampicilina, la penicilina G y la amoxicilina. Cuando las cepas son Peni-R, la amoxicilina es más activa que las anteriores (Appelbaum CID 2000) siendo además la única que mantiene unas concentraciones en suero por encima de la CMI₉₀ durante al menos el 40% del intervalo de dosis para cepas de neumococo Peni-I y Peni-R. En el grupo de las cefalosporinas, las más activas frente a infecciones producidas por cepas Peni-R son las de 3^a (ceftriaxona y cefotaxima) y 4^a generación (cefpiroma y cefepime) siendo cefotaxima y ceftriaxona los antibióticos de elección en el tratamiento de las meningitis neumocócicas producidas por cepas Peni-R (Liñares y cols 2000, Liñares y Tubau 1998). Además mantienen un T>CMI por encima del 90% del intervalo de dosis para las cepas de *S. pneumoniae* peni-R (Appelbaum 2000).

En nuestro trabajo decidimos utilizar amoxicilina y cefotaxima como antibióticos representativos del grupo de las penicilinas y cefalosporinas

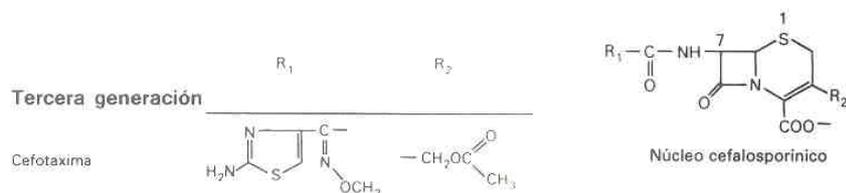
debido a sus características PK / PD y por su mayor actividad frente a las cepas de *S. pneumoniae* resistentes a penicilina.

6.1.1. ESTRUCTURA

La estructura básica de la amoxicilina consiste en la presencia de un anillo β -lactámico asociado a otro tiazolidínico de cinco componentes, lo que da origen al núcleo responsable de su actividad biológica, el **ácido 6-aminopenicilánico**; a él se asocia una cadena lateral cuya estructura se representa a continuación.



En cefotaxima el anillo β -lactámico se encuentra asociado a otro dihidrotiazidínico de seis componentes, formando así el **ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA)**, biológicamente activo; a diferencia de amoxicilina, son dos las cadenas laterales que se unen a este núcleo fundamental.



6.1.2 .MECANISMO DE ACCIÓN

Amoxicilina y cefotaxima ejercen una acción bactericida al alterar la pared celular bacteriana, estructura que no existe en las células humanas. La pared bacteriana se encuentra situada por fuera de la membrana citoplasmática y confiere al neumococo la resistencia necesaria para soportar, sin romperse, la elevada presión osmótica que existe en su interior. La acción de ambos antimicrobianos se desarrolla en la última fase de la síntesis del peptidoglicano de la pared celular, cuando se producen una serie de enlaces cruzados entre las cadenas de péptidos. La formación de estos enlaces o puentes es la que confiere rigidez a la pared bacteriana. Estos antibióticos impiden la reacción de transpeptidación y la inhibición es posible por la analogía estructural existente entre los β -lactámicos y la D-alanina terminal. La transpeptidasa es acilada por la penicilina con formación de peniciloil-enzima.

En la acción de la amoxicilina y la cefotaxima hay que considerar, al menos, dos etapas:

- a) Acceso a los sitios de acción: La pared celular es muy permeable a los β -lactámicos. Una vez atravesada, la sensibilidad de los neumococos a estos antibióticos depende del grado de afinidad por los puntos de fijación.
- b) Interacción con las proteínas fijadoras de penicilina (PBPs): Cuando la amoxicilina o la cefotaxima han alcanzado la cara externa de la membrana citoplasmática, se inicia una serie de procesos que terminan con la destrucción de los neumococos sensibles. El punto fundamental de la acción de este grupo de antibióticos son las PBPs, proteínas enzimáticas que participan en las últimas fases de la síntesis del peptidoglicano de la pared bacteriana. La estructura de una PBP (PBP2x) de *S. pneumoniae* ha sido recientemente determinada por cristalografía de rayos X (Pares y cols, 1996). Está formada por tres dominios: un dominio N-terminal estrechamente asociado a un dominio central de unión a penicilina y un dominio C-terminal conectado por medio de un lazo (“loop”) de 28 residuos. El dominio central de unión a penicilina, que es homólogo al de otras PBPs y β -lactamasas, contiene tres motivos de aminoácidos conservados que están relacionados con el sitio activo del enzima. La transpeptidación entre dos muropéptidos permite las reacciones cruzadas en el peptidoglicano. Las PBPs interactúan con los β -lactámicos por formación de un complejo relativamente estable vía el sitio activo de la serina y como consecuencia, se altera la pared bacteriana de modo que la mayor parte de las bacterias sensibles que se encuentren en un medio hipotónico sucumbirán ante la acción del antibiótico.

6.1.3. MECANISMOS DE RESISTENCIA EN *S. pneumoniae*

En las últimas décadas, el desarrollo de resistencia frente a estos antibióticos ha ocurrido en la mayoría de los patógenos comunes. El mecanismo de resistencia más sencillo y frecuente se debe a la acción de β -lactamasas mediadas por plásmidos, sin embargo, en el caso de

Streptococcus pneumoniae al no producir estas enzimas requiere mecanismos más complejos mediados por una sofisticada reestructuración de las dianas de los β -lactámicos, las PBPs.

Como ya comenté anteriormente, las PBPs interaccionaban con los β -lactámicos formando un complejo vía el sitio activo de la serina. La deacilación de este complejo resulta en una inactivación biológica del derivado de β -lactámico (Goffin y Guysen, 1998). Las mutaciones que contribuyen a la resistencia están localizadas en el dominio de unión a penicilina y ello reduce la afinidad a los β -lactámicos. Varias mutaciones en una PBP pueden ser requeridas para causar una disminución en la afinidad a penicilina y más de una PBP puede ser necesaria para que se adquiriera altos niveles de resistencia. En *S. pneumoniae*, alteraciones en la PBP2x y PBP2b confieren baja resistencia y son el prerrequisito para adquirir altos niveles de resistencia mediado por mutaciones en otras PBPs (Muñoz y cols, 1992; Grebe y Hakenbeck, 1996).

Un tercer nivel de mecanismos de resistencia ha sido identificado en mutantes de laboratorio. Dos genes (no PBP) han sido descritos: una glicosiltransferasa CpoA y una histidin protein quinasa, CiaH. Hakenbeck y cols 1999, han propuesto que esos genes (no PBP) están involucrados en la biosíntesis de los componentes de la pared celular como un paso previo a la biosíntesis de las funciones de las PBPs y que las mutaciones seleccionadas durante el tratamiento con β -lactámicos, contrarrestan los efectos causados por la inhibición de las PBPs.

Recientemente ha sido descrito un nuevo mecanismo de resistencia por alteraciones en el operón *murMN*. Las dos proteínas (murM y murN) intervienen en el proceso de biosíntesis de la pared celular. La inactivación del operón está relacionada con la eliminación de los muropéptidos ramificados de la pared celular y con la pérdida completa de resistencia a penicilina (Filipe y Tomasz 2000).

7. SEROTERAPIA EN LAS INFECCIONES PRODUCIDAS POR *Streptococcus pneumoniae*.

En la primera década del siglo XX la neumonía neumocócica era la primera enfermedad infecciosa de esa época por lo que la protección por suero anti-neumocócico recibió una considerable atención. La terapia humana con suero antineumocócico se justificaba por su capacidad para proteger a animales experimentales frente a una infección letal de neumococo (Casadevall y Scharff, 1995). El modelo más importante para estudiar la actividad de este suero fue la infección intraperitoneal en ratón, en el que tanto el neumococo como el suero se administraban vía IP al mismo tiempo y a veces se mezclaban en la misma jeringa. Para la producción de anticuerpos antineumocócicos se utilizaron diversos animales como caballos, monos y conejos. La inducción de suero en caballos necesitaba meses, y el coste derivado del cuidado de los animales, la purificación de anticuerpos y los estudios de protección en ratones hizo que la sueroterapia fuese cara. El suero de conejo ofreció ciertas ventajas sobre el de caballos y sobre el de ratones como mayor especificidad y menores costes. (Casadevall y Scharff, 1994)

La seroterapia era más efectiva si se comenzaba en los tres primeros días de iniciada la neumonía neumocócica. Aunque a veces se utilizó la vía subcutánea e intramuscular con el fin de reducir algunas reacciones adversas se prefirió la administración IV debido a su mayor efectividad. El tratamiento con suero antineumocócico en la era pre-antibiótica redujo la mortalidad de la neumonía neumocócica desde el 30-40% hasta un 10-20% aunque la utilización de estos sueros mostraba una elevada toxicidad, provocando reacciones de anafilaxia, fiebre y el síndrome de suero caracterizado por malestar, erupciones cutáneas y artralgias que aparecían a los 7-10 días de la terapia (Casadevall y Scharff, 1994).

Ahora en pleno siglo XXI, el éxito logrado en el control de las enfermedades infecciosas está siendo amenazado por el crecimiento en el número de individuos inmunocomprometidos, la emergencia de nuevos patógenos, la reemergencia de viejos patógenos y la generalizada aparición de resistencia a los fármacos antimicrobianos por parte de muchos microorganismos. Se ha demostrado que los hospedadores inmunocomprometidos crean nichos ecológicos que acogen a microorganismos poco virulentos (Armstrong, 1993) y se ha comprobado que la administración de anticuerpos podría reducir la infección en pacientes inmunodeprimidos (Pennington, 1990).

Sin embargo, los sueros hiperinmunes pasivamente inyectados como tratamiento, prácticamente no se usan en la actualidad. El desarrollo de inmunoprotección y/o inmunoterapia para solucionar el problema de la resistencia, puede proporcionar nuevas estrategias de supervivencia (Seller y Stiehm 2000). La administración de vacunas que provocan una respuesta activa de anticuerpos parece el camino más razonable para prevenir las enfermedades infecciosas.

8. PREVENCIÓN DE LA INFECCIÓN PRODUCIDA POR *Streptococcus pneumoniae*

La posibilidad de desarrollar vacunas compuestas por polisacáridos capsulares se basó en una serie de trabajos realizados en los años 30 en el laboratorio de Avery, en los que se puso de manifiesto la existencia de una cápsula de naturaleza polisacáridica que cubría la superficie del neumococo. Los primeros pasos en la vacunación frente a neumococo se llevaron a cabo tras la observación de que la presencia en un suero de anticuerpos frente a un serotipo capsular protegía de una infección posterior causada por cepas del mismo serotipo o de serotipos que presentan reacción cruzada con éste (Avery y Goebel, 1933). Estos trabajos culminaron con la elaboración de una vacuna antineumocócica hexavalente que fue, sin embargo, raramente usada

debido a la elevada eficacia terapéutica de la penicilina que había sido descubierta poco antes. En los años 40, al descubrirse que los neumococos eran extremadamente sensibles a la penicilina, las infecciones causadas por este microorganismo dejaron de considerarse un problema, introduciéndose el tratamiento antibiótico de forma rutinaria. Sin embargo en la década de los 60, Austrian y colaboradores observaron que, a pesar de la aparente eficacia terapéutica de la penicilina “*in vitro*”, la neumonía neumocócica causaba más muertes en Estados Unidos que ninguna otra enfermedad infecciosa (Austrian y Gold, 1964), llegando a la conclusión del fracaso de la penicilina en la disminución de la prevalencia de la bacteriemia neumocócica. Como consecuencia de esa observación la obtención de una vacuna eficaz que pudiera prevenir las infecciones neumocócicas invasivas volvió a ser un objetivo prioritario.

8.1. VACUNAS CONSTITUIDAS POR POLISACÁRIDO CAPSULAR

En los años 70, a los hechos indicados se sumó la emergencia de cepas resistentes a antibióticos, por lo que se reanudaron los esfuerzos para el desarrollo de mejores vacunas polisacáridicas frente a neumococo (Smit y cols, 1977).

La observación de que la protección inducida por la cápsula es tipo-específica unido a la existencia de 90 tipos capsulares diferentes (Henrichsen, 1995), complicó los primeros pasos. Gracias a que ciertos tipos de cápsula se han asociado a infecciones humanas con mayor frecuencia que otros, se desarrolló una vacuna compuesta por los tipos capsulares más prevalentes, en un principio por 14 (14-valente), y más tarde por 23 PS capsulares. Esta vacuna 23-valente presenta una cobertura del 83% y reduce el riesgo de infección sistémica en la población adulta (Hutchinson y cols, 1999). La eficacia de esta vacuna, sin embargo es aún debatida en algunos grupos de riesgo (Avanzini y cols, 1995; King y cols, 1996). En la población

anciana, se ha sugerido que la respuesta de anticuerpos tras la vacunación es baja, aunque un reciente meta-análisis de vacunación polisacáridica incluyendo un estudio en más de 65.000 pacientes, no mostró diferencias en cuanto a niveles de anticuerpos inducidos por la vacuna entre adultos y ancianos (Hutchinson y cols, 1999). Sin embargo, en los ancianos, la actividad de los anticuerpos parece baja, probablemente por una menor capacidad fagocítica y un incremento de base en la vulnerabilidad a la infección neumocócica (Romero-Steiner y cols, 1999). Para los niños menores de 2 años, la pobre inmunogenicidad de las vacunas polisacáridicas están fuera de duda (Pomat y cols, 1994; Stoeckle y cols, 1994) debido a la falta de respuesta frente a los polisacáridos capsulares a esas edades (antígenos T-independientes).

8.2. VACUNAS CONJUGADAS

Para superar la naturaleza timo-independiente de los antígenos polisacáridicos, los PS son conjugados a proteínas. Estas vacunas conjugadas son inmunogénicas en niños, pero en general, la respuesta de anticuerpos en adultos no se mejora si la comparamos con la vacuna convencional 23-valente (Briles y cols, 2000). Como proteínas utilizadas en la conjugación se suele utilizar toxoide diftérico CRM 197, proteínas de membrana externa de meningococo B o toxoide de tétanos (Eskola y Antilla, 1999). Los resultados en niños menores de 2 años parecen muy prometedores y en estos momentos ya ha sido licenciada una vacuna conjugada heptavalente en España (incluye los serogrupos: 4, 6, 9, 14, 18, 19 y 23). Estas vacunas presentan aún algunos aspectos que deberán ser analizados cuidadosamente. Los más significativos son los relacionados con su composición y con el número de serotipos que deberán incluirse. Aunque una vacuna

conjugada multivalente que contenga los 9 serotipos más virulentos podría cubrir del 80-90% de los serotipos neumocócicos aislados de pacientes en el mundo (Hausdorff y cols, 2000), se podría especular con un aumento de la incidencia de serotipos no incluidos en la vacuna (Lipsitch y cols 2000).

II. OBJETIVOS

Partiendo de que los antibióticos β -lactámicos actúan sobre la pared celular y los anticuerpos lo hacen sobre la superficie de los neumococos induciendo la muerte por opsonofagocitosis, nos propusimos explorar y medir *in vivo*, la posible colaboración de estos antibióticos y el sistema inmune. Tomando este hecho como punto de partida, los objetivos de este trabajo fueron los siguientes:

1. Desarrollar un modelo experimental murino de sepsis neumocócica que permitiera seleccionar una cepa resistente a penicilina y virulenta en ratones.
2. Determinar los niveles protectores de los antibióticos (amoxicilina y cefotaxima), del suero hiperinmune y de la combinación de ambos en el modelo experimental anterior.
3. Estudiar la farmacocinética de las dosis protectoras de cada uno de los antibióticos obtenidos individualmente y en la terapia combinada.
4. Determinar la relación entre el perfil bacteriémico y la eficacia antibacteriana de los antibióticos β -lactámicos, del suero hiperinmune y de la combinación de ambos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. ESTUDIO DE VIRULENCIA

1.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Todos los experimentos de la presente tesis en los que se necesitaron animales de experimentación se realizaron en ratones hembras de la estirpe Balb/C (Criffa, Lyon, Francia) con una edad entre 8 y 12 semanas y un peso que osciló entre 19 y 22 gramos.

1.2. SELECCIÓN DE LA CEPA DEL ESTUDIO

Con el objetivo de seleccionar una cepa virulenta en ratones Balb/C, se estudiaron 51 aislados clínicos de diferente origen con susceptibilidad disminuida a la penicilina (CMI $\geq 1\mu\text{g/ml}$) pertenecientes a los serotipos 6B, 14, 15, 19 y 23F. Las cepas bacterianas analizadas se detallan en la tabla (2). El inóculo que se utilizó fue $\geq 1 \cdot 10^6$ UFC/ml.

Tabla 2: Cepas de *Streptococcus pneumoniae*

| Cepa | Genotipo / fenotipo relevante | Referencia / origen |
|----------------------|-------------------------------|---------------------|
| <i>S. pneumoniae</i> | | |
| 23/98 | ST14 | A.Fenoll (CNM) |
| 79/98 | ST14 | “ |
| 265/98 | ST14 | “ |
| 45/98 | ST23F | “ |
| 80/98 | ST23F | “ |
| 404/98 | ST23F | “ |
| 93/99 | ST23F | “ |
| 77/98 | ST19 | “ |
| 84/98 | ST19 | “ |
| 238/98 | ST19 | “ |
| 378/98 | ST6B | “ |

| Cepa | Genotipo / fenotipo relevante | Referencia / origen |
|----------------|-------------------------------|-----------------------------|
| 99/98 | ST6B | “ |
| 293/98 | ST6B | A. Fenoll (CNM) |
| 1974/98 | ST6B | “ |
| 2135/98 | ST6B | “ |
| 1453/97 | ST6B | “ |
| 2126/98 | ST6B | “ |
| 2097/98 | ST6B | “ |
| 1970/98 | ST6B | “ |
| 1959/98 | ST6B | “ |
| 1958/98 | ST6B | “ |
| H-3942 | ST6B | Pérez Trallero et al (1998) |
| 15/99 | ST6B | A. Fenoll (CNM) |
| 449/99 | ST6B | “ |
| 1397/98 | ST9V | “ |
| 5/99 | ST9V | “ |
| 35/99 | ST9V | “ |
| 97/99 | ST9V | “ |
| 163/99 | ST9V | “ |
| 180/99 | ST9V | “ |
| 181/99 | ST9V | “ |
| 240/99 | ST9V | “ |
| 254/99 | ST9V | “ |
| 270/99 | ST9V | “ |
| 349/98 | ST9V | “ |
| 408/98 | ST9V | “ |
| 443/98 | ST9V | “ |
| 727/98 | ST9V | “ |
| 870/98 | ST9V | “ |
| 906/98 | ST9V | “ |
| 1386/98 | ST9V | “ |
| S9 | ST9V | J.Prieto (UCM) |
| 62/98 | ST15 | A. Fenoll (CNM) |
| 150/98 | ST15 | “ |
| 1405/98 | ST15 | “ |
| 1440/98 | ST15 | “ |
| 320/99 | ST15 | “ |
| 496/99 | ST15 | “ |
| 1831/99 | ST15 | “ |
| 2194/99 | ST15 | “ |

Las cepas reflejadas en negrita resultaron virulentas para el 100% de los animales estudiados.

1.2.1. CONSERVACIÓN Y CULTIVO DE LAS CEPAS DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*.

Todas las cepas de neumococo se conservaron congeladas a -80°C en leche descremada (Skim Milk, Difco) a partir de una suspensión densa de cultivos crecidos en placas de agar-sangre. Las cepas virulentas, se conservaron en glicerol al 15% (-80°C) a partir de una suspensión bacteriana en fase exponencial, partiendo de subcultivos frescos cada vez que se realizaba un experimento nuevo.

Las cepas de *Streptococcus pneumoniae* se cultivaron en medio líquido (37°C , 6-8 horas, sin agitación) y en medio sólido (37°C , 18-24 horas con 5% de CO_2 y sin agitación). Los cultivos en medio líquido se hicieron en caldo Todd-Hewitt (Difco) suplementado con 0,5% de extracto de levadura (TH+Y). El crecimiento de los cultivos se siguió por turbidimetría a 580nm (A_{580}) con un espectrofotómetro Shimadzu UV-1203, hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) de 0,3 que equivalía a 1×10^8 unidades formadoras de colonia/ml (UFC/ml). Para el cultivo en medio sólido de las especies de neumococo se utilizaron placas de agar-sangre (agar Mueller-Hinton (Oxoid), conteniendo 5% de sangre desfibrinada de carnero (Oxoid).

1.2.2. DOSIS LETAL 50 (DL_{50}) Y DOSIS LETAL 100 (DL_{100})

El estudio de virulencia de las cepas de neumococo que se relacionan en el apartado 1.2 de Materiales y Métodos, se realizó en grupos de 5 ratones por cepa. Los microorganismos se cultivaron en caldo TH-Y. Se hicieron 3 lavados en PBS pH 7,2 centrifugando a 3500 r.p.m durante 10

minutos, resuspendiendo finalmente en PBS. Cada ratón fue inoculado por vía intraperitoneal (IP) con 200 μ l de la suspensión bacteriana ($\geq 1 \cdot 10^6$ UFC/ml) inoculando en cada experimento un grupo control con 200 μ l de PBS. Se hizo un seguimiento de 7 días anotando diariamente el número de ratones muertos y el estado de salud (movilidad, pelo, ojos). Basándonos en los criterios de Briles y cols 1992, decidimos siete días como tiempo de seguimiento post-inoculación de los ratones. Se consideró cepa virulenta, aquella capaz de matar a todos los animales en un período de siete días.

Una vez conocidas las cepas virulentas de *S. pneumoniae* se determinó la DL_{50} y DL_{100} (mínima dosis de bacteria capaz de producir la muerte al 50% y 100% de los animales inoculados, respectivamente). La preparación de la cepa se ha explicado anteriormente. Se hicieron diluciones decimales en PBS de la suspensión bacteriana desde 1×10^8 UFC/ ml hasta 1×10^4 UFC/ ml inoculando 200 μ l/ratón por vía IP a lotes de 5 animales. En cada experimento se añadió un grupo control inoculado con PBS. Durante la semana de seguimiento se anotaron las muertes y el estado de salud de los animales.

2. SUSCEPTIBILIDAD DE LAS CEPAS DE NEUMOCOCO

Se determinó la susceptibilidad de las cepas virulentas a los dos antibióticos del estudio: amoxicilina (AMX) y cefotaxima (CTX). Posteriormente se determinó la actividad bactericida de los dos antibióticos mediante curvas de muerte bacteriana tan sólo para la cepa finalmente seleccionada (1515/97 ST 6B).

2.1 CMI y CMB

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se realizó por el método clásico de dilución en agar y por el método de dilución en caldo siguiendo las normas de la NCCLS. La determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) se realizó siguiendo también las normas de la NCCLS.

3.2 ACTIVIDAD BACTERICIDA “in vitro” DE LOS ANTIBIÓTICOS DEL ESTUDIO

La actividad bactericida de los dos antibióticos se analizó mediante curvas “in vitro” de muerte bacteriana (prueba bactericida) partiendo de diferentes concentraciones de antibiótico (0.5 CMI, 1 CMI, 2 CMI, 4 CMI y 8 CMI) y un inóculo de neumococo conocido (10^6 UFC/ml). La bacteria se cultivó hasta fase exponencial (D.O. de 0,3 A_{580nm}), centrifugándola a 3500 r.p.m. durante 10 minutos y resuspendiéndola posteriormente en PBS pH 7.2. En los tubos donde se analizó la actividad bactericida se añadió neumococo, antibiótico y caldo TH-Y con el fin de asegurar que la bacteria se pudiera multiplicar durante el experimento. La incubación se llevó a cabo en un baño a 37°C. Se realizaron diluciones decimales en PBS para recuento

de colonias en placas de agar sangre a lo largo de los tiempos; T_{0h} , $T_{1,5h}$, T_{3h} , T_{6h} y T_{9h} .

La actividad bactericida se expresó como porcentaje de reducción del inóculo inicial: $100 - (100 \times I_t / I_i)$, siendo la I_i la UFC/ml inicial e I_t la UFC/ml después de cada tiempo de incubación. (Miller y cols, 1990, Balcabao y cols, 1996)

3. SUEROTERAPIA

3.1 OBTENCIÓN DEL SUERO E INMUNIZACIÓN

El suero hiperinmune utilizado a lo largo de todos los experimentos fue inducido con la cepa 1515/97 ST 6B seleccionada para el estudio. La cepa se cultivó en medio TH-Y durante 6-8 horas hasta alcanzar 0,3 de D.O a 580nm (A_{580}), realizándose posteriormente 3 lavados en PBS. Con objeto de conocer la concentración final administrada a los ratones en la suspensión antigénica se realizó un recuento de bacterias en placas antes de la inactivación del neumococo. La cepa se inactivó a 56°C durante 1 hora. Para asegurar la esterilidad de la suspensión antigénica, se sembró una pequeña alícuota incubándola a 37°C en atmósfera de CO₂ durante 18-24 horas. El antígeno se conservó a -80°C hasta su utilización. La concentración de bacteria en la suspensión antigénica fue de $1 \cdot 10^8$ UFC/ml.

Se utilizaron dos lotes de ratones para obtener el suero. El grupo I formado por 80 hembras, fue inoculado por vía IP con 200 µl del antígeno mientras que el grupo II (20 ratones hembras) se inoculó por la misma vía con 200 µl del vehículo de la suspensión antigénica, PBS pH 7,2. La pauta de inmunización fue de una inoculación IP a la semana durante 5 semanas consecutivas. Una semana después de la última administración IP de la bacteria inactivada (grupo I) y del placebo (grupo II) se sangraron los animales mediante punción cardiaca. La sangre obtenida se dejó coagular durante una hora a T^a ambiente. A continuación se mantuvo durante 2-3 horas a 4°C para separar el suero y se centrifugó a 3000 r.p.m durante 10 minutos. El suero obtenido de los ratones de cada grupo se conservó a -80°C hasta su utilización.

3.2 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS EN EL SUERO

La determinación de anticuerpos IgG frente al polisacárido capsular 6B se realizó tanto en el suero de los ratones inoculados con PBS (suero no inmune), procedentes del grupo II como en el procedente de los ratones del grupo I (suero hiperinmune), mediante enzima inmuno ensayo (ELISA), de acuerdo al protocolo estandarizado de ELISA (Workshop at the Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia, 1996). La neutralización de los anticuerpos al polisacárido de la pared celular se llevó a cabo con CWPS (Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark). Se utilizó un conjugado de cabra-peroxidasa Horseradish anti ratón IgG (Bio-Rad, Richmond, Ca). La técnica del ELISA fue la siguiente:

- Fijar el polisacárido (PS) a la placa de ELISA a una concentración final de 20µg/ml. Incubar 5h a 37°C.
- Lavar 3 veces utilizando como tampón de lavado: PBS 1x + Tween 20 al 0,01%. El proceso de lavado se realizó en un lavador automático (Sanofi-Pasteur LP-35 París Francia).
- Diluir los sueros problema partiendo de la dilución 1/50 (suero problema + tampón bloqueante de PSC)
- El tampón bloqueante llevaba PBS 1x + BSA 1% + PSC 10 µg/ml + Tween 20 0,1%).
- Mantener 1 hora a T^a ambiente para que actúe el tampón bloqueante sobre el suero. Tras la hora se realizan diferentes diluciones (son diluciones dobles) utilizando el siguiente tampón: PBS 1x + BSA 1% + Tween 20 0,1%. Se añade 50µl de cada dilución a los pocillos correspondientes. Se tapa la placa de ELISA y se conserva a 4°C durante toda la noche.

- Al día siguiente, las placas se lavan 3 veces y se añade 50µl del conjugado anti ratón.
- Dejar 2 horas en agitación (15 r.p.m.) a T^a ambiente. Lavar 3 veces y añadir 100 µl / pocillo del sustrato de revelado (TMB). Mantener **15** minutos en agitación a temperatura ambiente y se añade 100µl de ácido sulfúrico diluido 1/10. Agitación durante 10-20 minutos.
 - Realizar la lectura mediante medición de la D.O.

3.3 OPSONOFAGOCITOSIS “in vitro”

Previamente al estudio “in vivo” (en el modelo experimental murino) entre el sistema inmunológico y los dos antibióticos, realizamos un experimento “in vitro” mediante opsonofagocitosis por muerte bacteriana para conocer la interacción entre ambos factores.

En primer lugar se eliminó el complemento del suero hiperinmune de ratón mediante incubación a 56°C durante 30 minutos. A continuación, se incubaron conjuntamente en un baño de agitación (225 r.p.m. 30 minutos, 37°C) la cepa de neumococo y el suero. De este modo los anticuerpos específicos se unen por la fracción Fab a los epítomos de la superficie bacteriana, quedando libre la fracción Fc. Transcurrido ese tiempo se añadió el complemento de cobayo (Hartley, Criffa., Lyon, Francia) incubando en baño de agitación durante 15 minutos. Durante este paso, el complemento se deposita directamente a la superficie bacteriana (vía alternativa) o bien se fija a la fracción Fc de los anticuerpos (vía clásica). Finalizado el período anterior se añadieron los neutrófilos polimorfonucleares (PMNs), obtenidos a partir de sangre fresca de ratón por el método de Eggleton y cols, 1989. La proporción PMNs:neumococo fue de 10 PMNs por cada neumococo. Se incubó durante 15 minutos en agitación. Finalmente se añadió caldo TH-Y para que la bacteria estuviese en fase de multiplicación activa, el antibiótico (AMX o CTX 1CMI) y HBSS con Ca y Mg para favorecer la actividad de

los PMNs. Se tomaron muestras a diferentes tiempos (T_0 , T_1 , T_2 , T_3 , T_4h) y se realizaron recuentos bacterianos en placas de agar sangre. Estas placas se incubaron a 37°C en 5% de CO_2 durante 18-24 horas.

3.4 PROTECCIÓN POR EL SUERO EN EL MODELO MURINO DE SEPSIS NEUMOCÓCICA.

Para los experimentos de protección por suero se utilizaron lotes de 5 ratones hembras. El día de los experimentos se descongelaron alícuotas del suero hiperinmune y del suero no inmune que manteníamos conservadas a -80°C .

3.4.1 SUERO NO INMUNE

El objetivo de este experimento fue comprobar que el suero procedente de animales no inmunizados (suero no inmune) no era protector. Para ello la cepa se cultivó en caldo TH-Y hasta fase exponencial (0,3 de D.O., 580nm) y se realizaron 3 lavados en PBS (3500 r.p.m., 10 min). Para confirmar que la dosis desafío de neumococo era la deseada (1-2 veces la DL_{100}), se hicieron recuentos en placas de agar sangre (incubándose a 37°C , 5% CO_2 durante 18-24 h).

En primer lugar se inyectó por vía IP 200 μl de diferentes diluciones de suero no inmune (puro y diluido al 1/5 y al 1/10) mientras que otro grupo de animales fue inoculado con el mismo volumen de PBS. Una hora después se inoculó por vía IP 200 μl de la suspensión bacteriana (1-2 veces la DL_{100}). Los animales fueron seguidos durante 7 días anotando diariamente la muerte y el estado de salud (movilidad, pelo, ojos). Una vez comprobado que la administración de suero no inmune no era protector y los animales morían de

igual modo que cuando se administraba PBS y con objeto de no consumir suero innecesariamente se utilizó PBS en los sucesivos experimentos de protección con suero hiperinmune.

3.4.2 SUERO HIPERINMUNE

El proceso de preparación de la suspensión bacteriana fue descrito en el punto anterior. Los animales fueron inyectados por vía IP con 200 μ l de las diferentes diluciones del suero (puro y diluido al 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 y 1/40) y una hora después se inoculó por vía IP 200 μ l de la suspensión letal de neumococo (1-2 veces la DL_{100}). Se consideró como dosis protectora del suero hiperinmune (DPS) aquella capaz de proteger de la muerte al 100% de los animales durante el período del estudio (7 días).

4. ANTIBIOTERAPIA

4.1 PRUEBAS DE PROTECCIÓN POR LOS ANTIBIÓTICOS EN EL MODELO MURINO DE SEPSIS.

Los antibióticos utilizados en el modelo experimental de sepsis murina fueron amoxicilina (clamoxyl® 500mg inyectable, lote N 5, de los laboratorios Smithkline Beecham) y cefotaxima (primafen® 250mg inyectable, lote P 001, de los laboratorios Hoechst Marion Roussel). El agua destilada estéril apirógena utilizada para las diluciones de los antibióticos fue la misma para todos los experimentos.

Los animales utilizados fueron ratones hembras Balb/C de entre 8-12 semanas de edad con un peso de 19-21 gramos. El antibiótico se preparó minutos antes de su inoculación y las dosis se calcularon en función del peso de los animales y del volumen administrado. Se inocularon a grupos de cinco animales diluciones medias de los antibióticos (desde 100 mg/Kg hasta 3,12 mg/Kg). Un grupo control se utilizó en cada experimento al que se le inoculó PBS en lugar de antibiótico. La vía de administración tanto del antibiótico como del placebo fue la subcutánea y el volumen inoculado de 100 µl. La pauta de tratamiento fue de una inoculación cada 8 horas durante 2 días, por lo que se administraron 6 dosis de antibiótico por experimento. Una hora antes de la administración del antibiótico se inyectó 200µl de la dosis letal de neumococo (1-2 veces la DL₁₀₀) por vía IP. Los animales fueron observados durante una semana anotándose diariamente el número de ratones muertos de cada lote y su estado de salud (pelo, movilidad, ojos). Se consideró como Mínima dosis protectora de antibiótico (MDPA) aquella capaz de proteger al 100% de los animales durante el periodo del estudio.

4.2. NIVELES EN EL SUERO DE RATÓN DE LA MDPA.

La concentración de antibiótico que se alcanzaba en el suero de ratón a diferentes tiempos tras inocular la MDPA para cada antibiótico, se determinó mediante la técnica de bioensayo. Se utilizaron dos tipos de cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 para determinación de la cefotaxima y *Micrococcus luteus* ATCC 9341 para la amoxicilina. Estas cepas se conservaron congeladas a -80°C en las mismas condiciones que los neumococos y se incubaron con fuerte agitación (37°C durante 24h, 225 rpm) para *E. coli* y sin agitación (30°C , 24-48h) para *M. luteus*. Los medios de cultivo se indican a continuación:

M.luteus

| <u>Medio sólido</u> | | <u>Medio líquido</u> | |
|-------------------------------------|------------|----------------------|------------|
| (medio de antibiótico n° 2 (Difco)) | | | |
| ▪ extracto de carne | 1,5g | extracto de carne | 1,5g |
| ▪ extracto de levadura | 3g | extracto de levadura | 3g |
| ▪ peptona | 6g | peptona | 5g |
| ▪ agar | 15g | cloruro sódico | 5g |
| ▪ agua destilada | csp 1000ml | agua destilada | csp 1000ml |

E.coli

| <u>Medio sólido</u> | | <u>Medio líquido</u> | |
|-------------------------------------|--|----------------------|----|
| (medio de antibiótico n° 2 (Difco)) | | | |
| | | polvo Lab-Lemco | 1g |
| | | extracto de levadura | 2g |
| | | peptona | 5g |
| | | cloruro sódico | 5g |

agua destilada csp 1000ml

El crecimiento de los cultivos de *E coli* y *M luteus* se siguieron por turbidimetría a 600nm (A_{600}) donde 1 D.O. equivalía a 1×10^8 UFC/ml.

La MDPA (100 μ l) se inoculó a lotes de cinco ratones por vía subcutánea sangrando por punción cardiaca a los tiempos. 5, 15, 30, 60, 90, 180, 240, 360 minutos y congelando los sueros a -80°C . El proceso de obtención del suero se explicó en el apartado 3.1 de Materiales y Métodos. Para determinar la concentración de antibiótico en el suero, se utilizaron placas del agar correspondiente (9ml) conteniendo una sobrecapa (4ml) de los microorganismos *Micrococcus luteus* y *Escherichia coli* para la amoxicilina y cefotaxima respectivamente. Los microorganismos se crecieron en el medio líquido y una vez alcanzada la concentración adecuada por turbidimetría se diluyó 100 veces añadiendo los 4ml a la capa de agar ya solidificada. A continuación se realizaron orificios en el agar y se añadieron 8 μ l de la muestra tanto de suero como de antibiótico. Se incubaron las placas a 30°C y 37°C para amoxicilina y cefotaxima respectivamente durante 18-24 horas. Puesto que no se conocía la concentración de antibiótico a los diferentes tiempos en el suero problema fue necesario hacer diluciones medias partiendo del suero puro hasta 1/1024 y sembrar en cada orificio una alícuota de esas diluciones.

La curva patrón se estableció con concentraciones conocidas del antibiótico representando en el eje de abscisas los $\mu\text{g/ml}$ de antibiótico y en el de ordenadas el diámetro del halo de inhibición. Para conocer la concentración de antibiótico en $\mu\text{g/ml}$ se extrapolan en esta curva los diámetros de los halos obtenidos con la muestra de suero. Esta determinación se repitió en todas las muestras de suero obtenidas en los diferentes tiempos.

5 ESTUDIOS DE TERAPIA COMBINADA

Una vez conocidas la MDPA para cada antibiótico y la DPS, el siguiente paso fue determinar las variaciones que pudieran ocurrir en estas dosis cuando se realizaba terapia combinada. Se combinaron diferentes dosis de antibióticos con diferentes diluciones del suero hiperinmune.

5.1 PRUEBAS DE PROTECCIÓN POR LA COMBINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS CON EL SUERO HIPERINMUNE EN EL MODELO MURINO DE SEPSIS

Se inyectaron en el mismo animal y en forma cruzada, fracciones de la DPS y MDPA a grupos de 5 ratones incluyendo como grupos controles las fracciones de los dos elementos por separado (diluciones de suero y concentraciones de antibiótico). El grupo control de letalidad recibió PBS en lugar de suero una hora antes de la bacteria y PBS en lugar de antibiótico cada 8 horas durante 2 días. Todos los animales recibieron una dosis letal de neumococo (1-2 veces la DL_{100}). Se hicieron recuentos en placas de agar sangre para comprobar la dosis desafío de neumococo. El esquema de inoculación fue el siguiente:

| | DPS | DPS/2 | DPS/4 | DPS/8 | DPS/16 |
|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| MDPA | 5 RATONES | 5 RATONES | 5 RATONES | 5 RATONES | 5 RATONES |
| MDPA/2 | 5 RATONES | 5 RATONES | 5 RATONES | 5 RATONES | 5 RATONES |
| MDPA/4 | 5 RATONES | 5 RATONES | 5 RATONES | 5 RATONES | 5 RATONES |
| MDPA/8 | 5 RATONES | 5 RATONES | 5 RATONES | 5 RATONES | 5 RATONES |

| | | | | | |
|----------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| MDPA/16 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| | RATONES | RATONES | RATONES | RATONES | RATONES |

A este esquema hay que sumarle los controles de suero, antibiótico y letalidad. Las pautas de administración en todos los grupos fueron las siguientes: en primer lugar se inoculó por vía IP 200 µl de la dilución correspondiente de suero hiperinmune seguido una hora después de la dosis desafío de bacteria (200 µl vía IP). Una hora más tarde se administró por vía subcutánea, 100 µl de la dosis correspondiente de antibiótico cada 8 horas durante 2 días.

5.2 NIVELES EN EL SUERO DE RATÓN DE LA MDP A OBTENIDA EN LA COMBINACIÓN

Se utilizaron lotes de 5 ratones a los que se les inoculó la mínima dosis de antibiótico que protegió al 100% de los animales en combinación con el suero (obtenida en los estudios de terapia combinada). Lotes de cinco animales se sangraron mediante punción cardíaca a diferentes tiempos para obtener el suero. La metodología y los tiempos se explicaron en el apartado 4.2 y el proceso de obtención del suero en el apartado 3.1 de Material y Métodos.

5.3 TERAPIA COMBINADA CONJUNTA

En este experimento la administración del suero y el antibiótico se hizo conjuntamente (ambos una hora después de la inoculación de la bacteria). Se analizó la combinación de AMX 3,12 mg/Kg y suero 1/4 incluyendo los respectivos controles. Se utilizaron lotes de 5 ratones a los que se les inoculó la dosis desafío de neumococo (1-2 veces la DL_{100}) y una

hora después se administró el suero no inmune diluido al 1/4 o suero inmune diluido al 1/4 y/o el antibiótico (AMX 3,12 mg/Kg). El neumococo se inoculó por vía IP (200 µl), el suero se administró por vía IP (200 µl) y el antibiótico por vía SC (100 µl) cada 8 horas, un total de 6 dosis.

Los grupos fueron los siguientes:

GRUPO I: Control de letalidad: neumococo + suero no inmune 1/4 + PBS

GRUPO II: Control de antibiótico: neumococo + suero no inmune 1/4 + AMX 3,12 mg/Kg

GRUPO III: Control de suero hiperinmune: neumococo + suero hiperinmune 1/4

GRUPO IV: Terapia combinada: neumococo + suero hiperinmune 1/4 + AMX 3,12 mg/Kg

6 PERFILES BACTERIÉMICOS

6.1 PERFIL BACTERIÉMICO DE LA CEPA DEL ESTUDIO

Con el fin de conocer el comportamiento in vivo de la bacteria inoculada por vía IP en el ratón y analizar la posible eliminación de la bacteria en sangre, se determinó el perfil bacteriémico de la cepa infectante de neumococo. Se inocularon lotes de 5 animales con 200µl de dosis letales y no letales de neumococo (10^8 - 10^6 - 10^4 UFC/ml). A continuación, se tomaron muestras de la vena de la cola de los animales a los tiempos 2, 4, 6, 8, 24 horas y a partir de ahí, una muestra diaria hasta que los animales muriesen o la sangre permaneciera estéril durante tres días. Previamente a la toma de muestra se hizo una limpieza y desinfección de la cola de los animales con algodón empapado en alcohol y posteriormente la cola de los animales se anestesió con el anestésico local cloruro de etilo (Cloretilo®, laboratorios ERN, lote L-01). Tras esperar unos segundos para que el

anestésico hiciera su efecto se cortó con tijeras el extremo final de la cola recogiendo con un asa calibrada 8 μ l de sangre de la gota que se inicia. Para evitar posibles infecciones tras la obtención de sangre, la cola del animal se tapaba con esparadrapo de papel. Las muestras posteriores de sangre de la cola se recogían presionando suavemente con los dedos desde la parte superior de la cola y en un ligero movimiento descendente. De esta manera la pérdida de sangre era mínima y se evitaba el peligro de una pérdida descontrolada que pudiera provocar un estado de anemia e inmunodepresión al animal. Los cinco animales de cada lote fueron señalados con distintas marcas con el fin de seguir a cada animal de manera independiente dentro de un mismo lote. El asa calibrada con la sangre se resuspendía en un tubo eppendorf con caldo TH-Y (64 μ l) y anticoagulante (citrato trisódico) al 10% (8 μ l) quedando la sangre diluida al 10%. Los tubos se mantenían en hielo hasta su posterior titulación. Para determinar la concentración de bacteria en la sangre se realizaron diluciones decimales, sembrando una pequeña alícuota en placas de agar sangre que se incubaron a 37°C en 5% de CO₂. Los resultados se expresaron como UFC/ml.

6.2 PERFIL BACTERIÉMICO DE LOS β -LACTÁMICOS

La metodología fue la misma que la utilizada en el apartado anterior sólo que en esta ocasión el inóculo bacteriano para todos los lotes fue el mismo (1-2 veces la DL₁₀₀). Se utilizaron lotes de 5 ratones a los que se inoculó la bacteria y una hora después las diferentes dosis de los antibióticos cada 8 horas durante 2 días (diluciones dobles desde 100 mg/Kg hasta 6,25 mg/kg). El grupo control recibió PBS en lugar de antibiótico. Las muestras fueron tomadas a las 2, 4, 6, 24 horas y una toma diaria hasta la muerte de los animales o eliminación total de la bacteria en sangre.

6.3 PERFIL BACTERIÉMICO DEL SUERO HIPERINMUNE.

En este experimento se administraron diferentes diluciones del suero hiperinmune (no diluido, diluido al 1/4 y diluido al 1/16) a lotes de cinco animales. Una hora después se administró una dosis letal de neumococo (1-2 veces la DL_{100}). La metodología se describió en el apartado 6.1.

6.4 PERFIL BACTERIÉMICO DE LA COMBINACIÓN MDPS-MDPA.

Se utilizaron lotes de cinco animales que se inocularon del mismo modo que se indica en el apartado 5 de Materiales y Métodos. La metodología de procesamiento tanto de animales como de muestras vienen especificadas en el apartado 6.1. Como dosis letal de neumococo se utilizó 1-2 veces la DL_{100} . En este estudio sólo se administró el antibiótico amoxicilina. La dosis de antibiótico analizada fue de 3,12 mg/Kg y se combinó con las diluciones de suero 1/4, 1/8 y 1/16.

7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La probabilidad de supervivencia de los grupos administrados con suero frente al control (placebo) se comparó estadísticamente utilizando el test de log rank. Un nivel de significado de 0,05 se consideró en todas las comparaciones. La comparación de la supervivencia con cada antibiótico y dilución de suero se hizo mediante el modelo de riesgo proporcional o modelo de Cox. Este modelo plantea el logaritmo del riesgo relativo como una función lineal de las variables independientes. Se supone, por lo tanto, que el riesgo relativo, a diferencia del riesgo propiamente dicho, no depende del tiempo o, dicho de otra manera, que es constante a lo largo del tiempo (de ahí el nombre de modelo de riesgo proporcional). Para calcular la dosis eficaz 50 (DE_{50}) en el modelo teórico, utilizando la dosis como covariable y el

antibiótico como factor, se utilizó el método de análisis de regresión de Probit. En suma, las siguientes interacciones entre las diluciones de suero-antibióticos, dosis de antibiótico-antibióticos y dosis de antibiótico-

diluciones de sueros se incluyeron en el modelo inicial (acercamiento farmacocinético). Se realizó un análisis complementario similar utilizando la dosis de antibiótico/CMI como factor en lugar de la dosis de antibiótico (acercamiento farmacodinámico). Se consideraron niveles de significado de 0,05. Un rango de riesgo igual a 1 se consideró como criterio para tener la misma eficacia.

Las curvas de supervivencia (bacteria, suero, antibiótico y combinación) se obtuvieron por el método de Kaplan-Meier que es un método no paramétrico (no asume ninguna función de probabilidad) y por máxima verosimilitud, es decir se basa en maximizar la función de verosimilitud de la muestra. Para analizar la relación entre la máxima UFC/ml y el desenlace (muerte/supervivencia) por individuo se utilizó el método de análisis binario de regresión logística.

8 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO

Las curvas de antibiótico concentración-tiempo para cada antibiótico se analizaron mediante un acercamiento no compartimental utilizando el programa Win-Nonlin (Pharsight, Mountain View, California). Las curvas de áreas bajo la curva concentración-tiempo (AUCs) desde el tiempo cero hasta el infinito ($AUC_{0-\infty}$) se calcularon a partir de la ecuación $AUC_{0-480} + AUC_{480-\infty}$ (donde 480 indica 480 minutos). Los valores de AUC_{0-480} se calcularon a partir de los puntos de los niveles en suero frente al tiempo utilizando la regla trapezoidal. Los valores de $AUC_{480-\infty}$ se obtuvieron de la expresión C_{480}/β , donde C_{480} es la concentración a los 480 minutos y β es la pendiente obtenida de la regresión de al menos cuatro cuadrantes de la fase

de eliminación terminal. β se calculó para cada antibiótico a partir de los niveles en suero de los últimos tres tiempos de muestras (Pérez-Trallero y cols, 1998). La concentración teórica a tiempo cero (obtenida por extrapolación al origen de la línea de regresión de eliminación) se definió como la concentración máxima en el suero (C_{max}). El $\Delta T > CMI$ se calculó gráficamente a partir de los puntos semilogarítmicos de los datos concentración-tiempo.

IV. RESULTADOS

1. ESTUDIO DE VIRULENCIA

1.1 SELECCIÓN DE CEPAS VIRULENTAS

Todas las cepas de neumococo del apartado 1 de Materiales y Métodos fueron inoculadas en cinco ratones hembras Balb/C de 8-12 semanas de edad para conocer su virulencia. La concentración bacteriana que se inoculó por vía IP fue $\geq 10^6$ UFC/ml. Se consideró cepa virulenta aquella capaz de producir un 100% de mortalidad en un período de 7 días. Las cepas estudiadas pertenecían a cinco STs (6B, 14, 15, 19 y 23). Las únicas cepas virulentas que produjeron un 100% de muerte eran de dos serotipos diferentes, el ST 6B (cepa **2126/98** y cepa **1515/97**) y el ST 15 (cepa **1405/98**). Las cepas 35/99 de ST 9V y las cepas 1974/98, 1453/97, 2097/98, 1959/98 y 1958/98 del ST 6B solamente mataron uno de los cinco animales inoculados. La cepa H-3942 perteneciente también al ST 6B, mató dos de los cinco animales. El resto de las cepas no produjeron la muerte de ningún animal incluso con concentraciones por encima de 2×10^8 UFC/ml. En los estudios posteriores solamente se utilizaron las cepas (1515/97 y 1405/98) que fueron 100% letales. La cepa 2126/98 ST 6B fue desestimada por producir la muerte de los animales al final del período de seguimiento.

1.2 DETERMINACIÓN DE LA DL₅₀ y DL₁₀₀

Se realizaron 4 experimentos independientes para determinar la DL₅₀ y DL₁₀₀ (dosis que produce la muerte en el 50% y 100% de los animales respectivamente). La DL₅₀ de la cepa 1515/97 ST 6B fue de 1×10^7 UFC/ml mientras que la DL₁₀₀ fue de 1×10^8 UFC/ml. La DL₅₀ de la cepa 1405/98, ST 15, fue de 5×10^5 UFC/ml y la DL₁₀₀ de 1×10^7 UFC/ml. Respecto al tiempo de

muerte, la DL_{100} de la cepa ST 6B produjo la muerte en las primeras 48 horas mientras que la cepa de ST 15 lo hizo en 72 horas.

2. SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS DEL ESTUDIO DE LAS CEPAS DE NEUMOCOCCO SELECCIONADAS

2.1 CMI y CMB

Se determinó la CMI / CMB para las dos cepas anteriores por dilución en agar para penicilina, amoxicilina (AMX) y cefotaxima (CTX) y por macrodilución en caldo para AMX y CTX. Los estudios de susceptibilidad se repitieron 5 veces. Los resultados vienen reflejados en la tabla siguiente.

Tabla 3: CMI / CMB de las dos cepas virulentas.

| | PENICILINA ($\mu\text{g/ml}$) | | AMOXICILINA ($\mu\text{g/ml}$) | CEFOTAXIMA ($\mu\text{g/ml}$) |
|---------|------------------------------------|----------|-------------------------------------|------------------------------------|
| 1515/97 | AGAR | 2 | 2 | 1 |
| ST 6B | CALDO | -- | 4 / 4 | 2 / 4 |
| 1405/98 | AGAR | 2 | 4 | 1 |
| ST 15 | CALDO | -- | 16 / 16 | 2 / 4 |

-- : **No determinado**

Finalmente y a la vista de estos resultados se seleccionó la cepa 1515/97 ST 6B para los estudios posteriores porque su CMI/CMB fue similar con los 2 antibióticos del estudio mientras que en la cepa de ST 15 hubo mayor diferencia (hasta 4 diluciones) en estos dos parámetros. Por otro lado, el ST 6B produce infecciones en la población general con mayor frecuencia que el ST 15.

2.2 ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LOS ANTIBIÓTICOS DEL ESTUDIO.

Una vez seleccionada la cepa 1515/97 ST 6B, como cepa del estudio, el siguiente paso fue analizar la actividad bactericida de concentraciones inhibitorias y subinhibitorias de los dos antibióticos (AMX y CTX). En las figuras (3 y 4) se indica el valor medio de los resultados de tres curvas de muerte realizadas independientemente. La máxima actividad bactericida se obtuvo para AMX y CTX con concentraciones $\geq 2 \times \text{CMI}$ reduciéndose el inóculo inicial hasta 6,14 Log UFC/ml con AMX y 5,05 Log UFC/ml con CTX al cabo de las 9 horas de exposición. El antibiótico AMX presentó 10 veces mayor reducción del inóculo que la CTX.

Figura 3: Curvas de muerte de la cepa 1515/97 ST 6B frente a amoxicilina.

| Tiempo | Control | 0,5 CMI | 1 CMI | 2 CMI | 4 CMI | 8 CMI |
|-------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 0 | 1,04E+07 | 1,04E+07 | 1,04E+07 | 1,04E+07 | 1,04E+07 | 1,04E+07 |
| 1,5 | 5,09E+07 | 3,21E+06 | 3,22E+05 | 1,01E+05 | 1,62E+05 | 1,85E+05 |
| 3 | 6,38E+07 | 2,32E+05 | 2,39E+04 | 9,32E+03 | 7,29E+03 | 3,60E+03 |
| 6 | 8,23E+07 | 2,08E+05 | 5,88E+02 | 3,82E+02 | 1,59E+02 | 4,54E+01 |
| 9 | 3,07E+06 | 5,23E+04 | 5,26E+02 | 7,50E+00 | 1,13E+01 | 5,00E+00 |
| % Reducción 1,5h: | -388 | 69 | 97 | 99 | 98 | 98 |
| % Reducción 3h: | -511 | 98 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| % Reducción 6h: | -689 | 98 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| % Reducción 9h: | 71 | 99 | 100 | 100 | 100 | 100 |

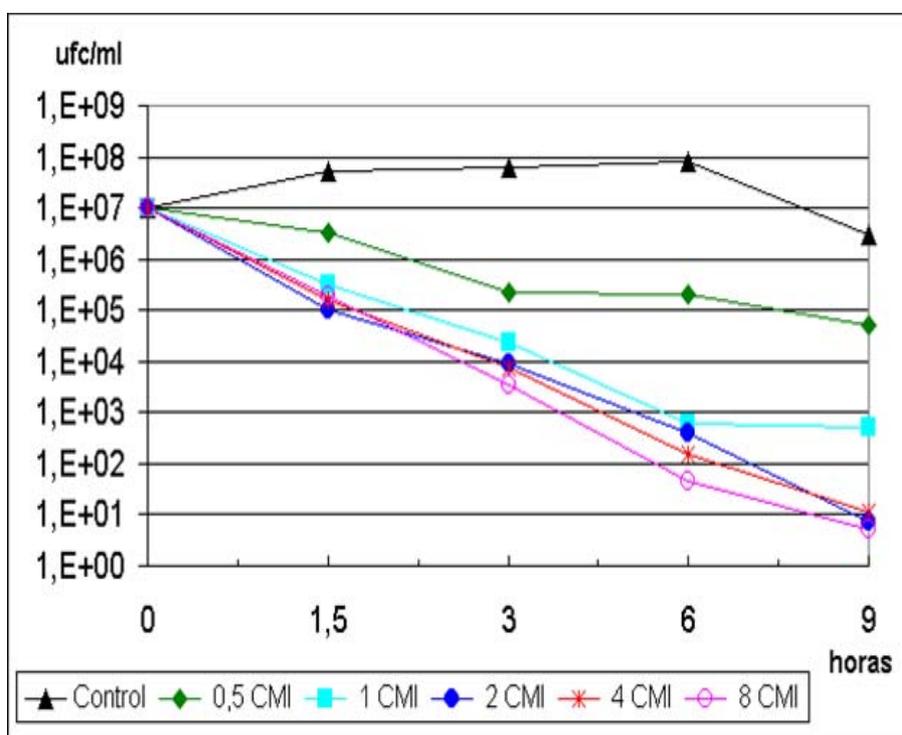
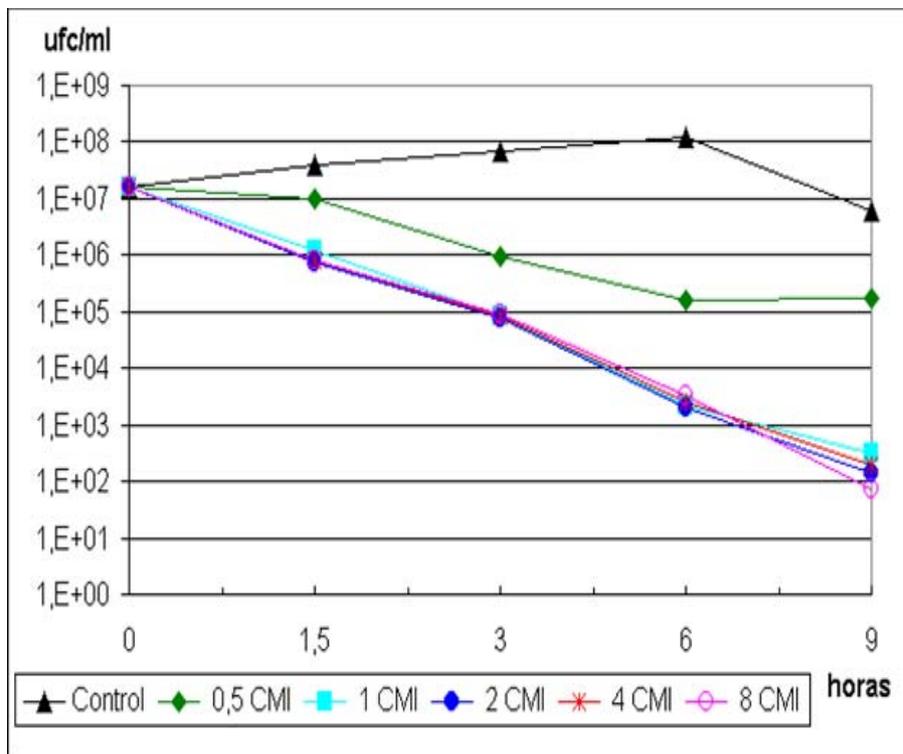


Figura 4: Curvas de muerte de la cepa 1515/97 ST 6B frente a cefotaxima.

| Tiempo | Control | 0,5 CMI | 1 CMI | 2 CMI | 4 CMI | 8 CMI |
|-------------------|----------------|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 0 | 1,60E+07 | 1,60E+07 | 1,60E+07 | 1,60E+07 | 1,60E+07 | 1,60E+07 |
| 1,5 | 3,98E+07 | 9,53E+06 | 1,25E+06 | 7,71E+05 | 8,36E+05 | 7,76E+05 |
| 3 | 6,72E+07 | 9,23E+05 | 8,40E+04 | 7,83E+04 | 8,35E+04 | 9,41E+04 |
| 6 | 1,18E+08 | 1,55E+05 | 2,10E+03 | 2,06E+03 | 2,63E+03 | 3,17E+03 |
| 9 | 6,10E+06 | 1,77E+05 | 3,26E+02 | 1,42E+02 | 1,93E+02 | 7,08E+01 |
| % Reducción 1,5h: | -148 | 41 | 92 | 95 | 95 | 95 |
| % Reducción 3h: | -319 | 94 | 99 | 100 | 99 | 99 |
| % Reducción 6h: | -636 | 99 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| % Reducción 9h: | 62 | 99 | 100 | 100 | 100 | 100 |



3. SUERO HIPERINMUNE

3.1 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS EN EL SUERO HIPERINMUNE

El nivel de anticuerpos frente al polisacárido capsular 6B se determinó en el suero hiperinmune mediante un ensayo de ELISA, obteniéndose un título de 1/400. Como control (suero no inmune) se utilizó suero procedente de animales no inmunizados pertenecientes a la misma camada.

3.2 OPSONOFAGOCITOSIS “in vitro”

Este estudio se hizo como paso previo al modelo experimental murino con la finalidad de obtener información orientativa sobre la acción combinada de los antibióticos y el suero hiperinmune. La prueba de opsonofagocitosis se analizó mediante curvas de muerte bacteriana y los resultados se muestran en la figura (5). Las curvas que se realizaron fueron las siguientes:

S: Bacteria + suero descomplementado (5%) + complemento (5%)

SP: Bacteria + suero descomplementado (5%) + complemento (5%) + PMNs

P: Bacteria + PMNs

SA: Bacteria + suero descomplementado (5%) + complemento (5%) + amoxicilina (1CMI)

SX: Bacteria + suero descomplementado (5%) + complemento (5%) + cefotaxima (1CMI)

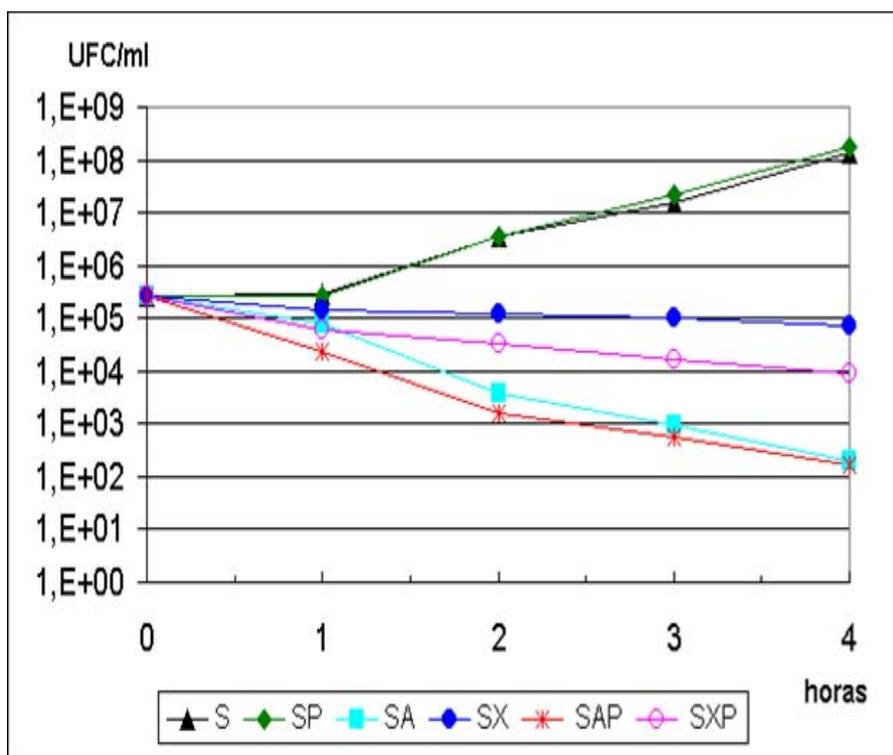
SAP: Bacteria + suero descomplementado (5%) + complemento (5%) + amoxicilina (1CMI) + PMNs

SXP: Bacteria + suero descomplementado (5%) + complemento (5%) + cefotaxima (1CMI) + PMNs

Los porcentajes indican la concentración final de suero y complemento de cobayo. La proporción neumococo : PMNs fue de 1:10. La curva P control demostró que sin la presencia de anticuerpos y complemento no existía fagocitosis. En experimentos posteriores se decidió no repetirla. Los resultados de las curvas corresponden a la media de dos experimentos de opsonofagocitosis. Sólo se incluyen los experimentos en los que la viabilidad inicial fue superior al 95%. En todos los experimentos posteriores la viabilidad final osciló en torno al 90-95 %. La combinación de antibiótico y sistema inmune mostró una mayor actividad bactericida que la obtenida con el antibiótico y el sistema inmune de forma independiente.

Figura 5: Curvas de opsonofagocitosis utilizando suero hiperinmune de ratón.

| Tiempo | S | SP | SA | SX | SAP | SXP |
|-----------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 0 | 2,58E+05 | 2,58E+05 | 2,58E+05 | 2,58E+05 | 2,58E+05 | 2,58E+05 |
| 1 | 2,93E+05 | 2,58E+05 | 7,63E+04 | 1,51E+05 | 2,40E+04 | 6,20E+04 |
| 2 | 3,63E+06 | 3,46E+06 | 3,78E+03 | 1,19E+05 | 1,56E+03 | 3,40E+04 |
| 3 | 1,58E+07 | 2,30E+07 | 9,50E+02 | 1,05E+05 | 5,75E+02 | 1,68E+04 |
| 4 | 1,33E+08 | 1,83E+08 | 2,00E+02 | 6,99E+04 | 1,62E+02 | 9,08E+03 |
| % Reducción 1h: | -14 | 0 | 70 | 42 | 91 | 76 |
| % Reducción 2h: | -1308 | -1242 | 99 | 54 | 99 | 87 |
| % Reducción 3h: | -6026 | -8832 | 100 | 59 | 100 | 93 |
| % Reducción 4h: | -51356 | -70774 | 100 | 73 | 100 | 96 |



3.3 PRUEBAS DE PROTECCIÓN

3.3.1 Suero no inmune

Previamente a la determinación de la DPS, se realizó un experimento para conocer si la administración de suero no inmune (S.N.I.) presentaba algún tipo de protección frente a la sepsis neumocócica producida por la cepa 1515/97. Se analizó el S.N.I. diluido cinco veces (1/5), diez veces (1/10) o no diluido (puro) y se incluyó un grupo de animales con PBS en lugar de S.N.I. La concentración de bacteria inoculada fue de 2×10^8 UFC/ml.

De los resultados que aparecen en la tabla (4) se aprecia que tanto la administración de S.N.I. como de PBS no protegió y además la muerte ocurrió en las primeras 48-72 horas. Basándonos en estos resultados, se utilizó PBS en lugar de S.N.I. para los sucesivos experimentos. Todos los lotes contenían 5 ratones excepto el S.N.I. diluido 1/5 que estuvo formado por 10 animales.

Tabla 4: Protección con suero no inmune (S.N.I.) puro, diluido al 1/5, diluido al 1/10 y controles de PBS. (> = animal muerto)

| LOTE | DÍA 1 | DÍA 2 | DÍA 3 | DÍA 4 | DÍA 5 | DÍA 6 | DÍA 7 | % PROTECCIÓN |
|--------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------------|
| S.N.I. puro | 3> | 2> | | | | | | 0 |
| S.N.I. 1/5 | 3> | 7> | | | | | | 0 |
| S.N.I. 1/10 | 4> | | 1> | | | | | 0 |
| PBS | 4> | 1> | | | | | | 0 |

3.3.2 Suero hiperinmune: Determinación de la DPS

Para determinar la DPS (dosis protectora de suero hiperinmune) se realizaron un total de 10 experimentos de protección. En siete de los diez experimentos se utilizaron lotes de cinco animales, en uno, un lote de cuatro animales y en dos, dos lotes de 10 animales. Los resultados vienen expresados en la tabla (5). El % de protección es el resultado de la media de los diez experimentos realizados. No se consiguió el 100% de protección en ninguna de las diluciones incluido el suero puro aunque si se observó que la protección fue concentración dependiente. Se consideró DPS a la dilución 1/4 de suero hiperinmune.

Tabla 5: Protección con suero hiperinmune puro y con diferentes diluciones.

| Dilución de suero | puro | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/25 | 1/32 | 1/40 |
|-------------------|------|-----|-----|-----|------|------|------|------|
| % Protección | 60 | 100 | 100 | 80 | 20 | 20 | 0 | 0 |
| | | 100 | 100 | 40 | 0 | | | |
| | | 60 | 40 | 0 | 100 | | | |
| | | 0 | 0 | 20 | | | | |
| | | | 50 | 80 | | | | |
| | | | 50 | 100 | | | | |
| | | | 60 | 75 | | | | |
| | | | | 10 | | | | |
| | | | | 30 | | | | |
| | | | 10 | | | | | |
| % FINAL | 60 | 60 | 60 | 40 | 40 | 20 | 0 | 0 |

4. ANTIBIÓTICOS

4.1 PRUEBAS DE PROTECCIÓN POR LOS ANTIBIÓTICOS EN EL MODELO MURINO DE SEPSIS.

Con la finalidad de conocer la mínima dosis de antibiótico que protegía de la muerte al 100% de los animales (MDPA), se realizaron 5 experimentos de protección para la AMX y 6 experimentos para la CTX. En todos los experimentos se utilizaron lotes de 5 animales excepto un lote de CTX 50 mg/Kg en el que se usaron 4 animales. Las características de los antibióticos así como la pauta de administración vienen reflejadas en el apartado 4.1 de Materiales y Métodos. Las dosis de los antibióticos se prepararon en función del peso de los animales. Los resultados de protección para ambos antibióticos pueden verse en las tablas (6 y 7).

Tabla 6: Protección con diferentes dosis de amoxicilina

| DOSIS | 100 mg/Kg | 50 mg/ Kg | 25 mg/ Kg | 12,5 mg/ Kg | 6,25 mg/ Kg | 3,12 mg/ Kg | 1,6 mg /K g |
|---------------------|--------------|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------------------|
| % Protec ción | 100 | 100 | 100 | 60 | 0 | 0 | 0 |
| | | 100 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 100 | | | | |
| | | | 100 | | | | |
| % FINAL | 100 | 100 | 100 | 30 | 0 | 0 | 0 |

Tabla 7: Protección con diferentes dosis de cefotaxima

| DOSIS | 100 mg/ Kg | 50 mg/Kg | 25 mg/Kg | 12,5 mg/ Kg | 6,25 mg/ Kg | 3,12 mg/ Kg | 1,6 mg /Kg g |
|---------------------|------------------|-------------|-------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|
| % Protec ción | 100 | 100 | 80 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 80 | 40 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 60 | 20 | | | | |
| | | 75 | 0 | | | | |
| | | 100 | | | | | |
| | | 60 | | | | | |
| % FINAL | 100 | 80 | 35 | 0 | 0 | 0 | 0 |

La MDPa para AMX y CTX fue de 25 mg/Kg y 100 mg/Kg respectivamente. En el caso de la CTX se decidió utilizar la dosis 50 mg/Kg como MDPa en los estudios de terapia combinada ya que la protección obtenida fue cercana al 100% y la dosis, similar a la MDPa para AMX.

4.2 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE ANTIBIÓTICOS CORRESPONDIENTES A LA MDPa

Una vez conocidas la DPS y la MDPa para cada antibiótico se decidió determinar las concentraciones séricas de los anticuerpos y de los antibióticos alcanzadas en el ratón por esas dosis. Para ello, lotes de cinco animales fueron inoculados con la MDPa obteniéndose posteriormente sangre de los animales a diferentes tiempos mediante punción cardiaca. La metodología viene explicada en el apartado 4.2 de Materiales y Métodos.

Las concentraciones de antibiótico alcanzadas a diferentes tiempos vienen reflejadas en las figuras y tablas que se muestran a continuación.

Figura 6: Curva patrón de amoxicilina.

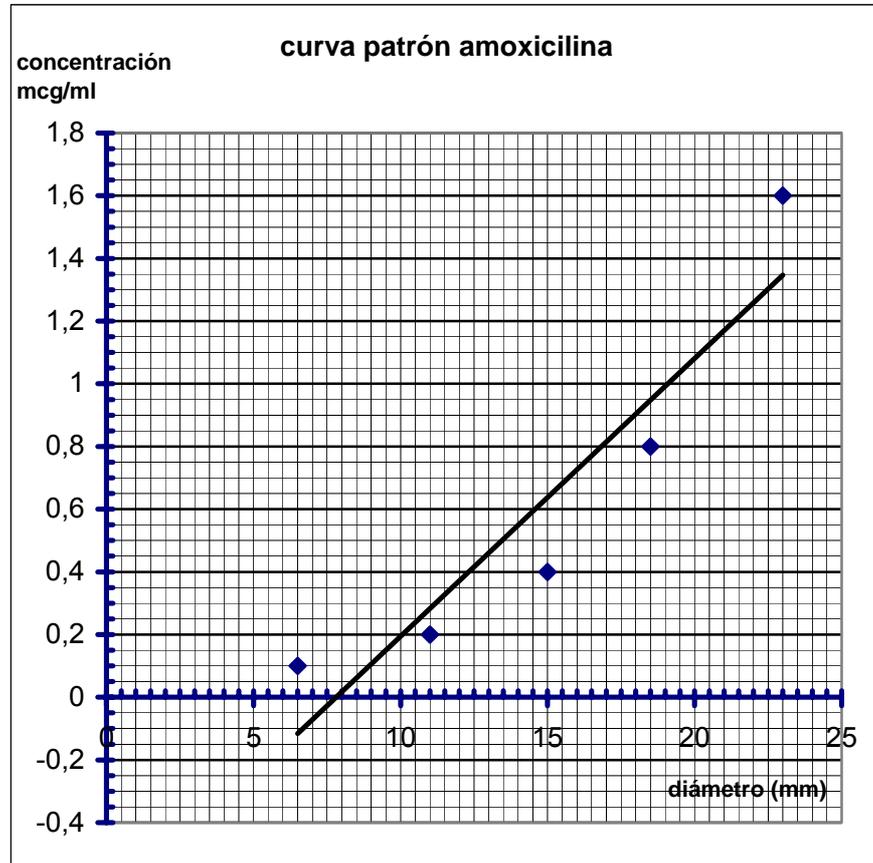


Tabla 8: Datos del diámetro de halo en milímetros y concentración de amoxicilina correspondiente.

| Curva patrón | |
|--------------|--------------------------------|
| Diametro | Concentración $\mu\text{g/ml}$ |
| 23 | 1,6 |

| | |
|------|-----|
| 18,5 | 0,8 |
| 15 | 0,4 |
| 11 | 0,2 |
| 6,5 | 0,1 |

Tabla 9: Datos de las concentraciones de antibiótico obtenidas por la MDPA de amoxicilina (25 mg/Kg) alcanzadas a cada tiempo tras extrapolar en la curva patrón.

| | 5 minutos | 15 minutos | 30 minutos | 1 hora | 2 horas | 4 horas | 6 horas | 8 horas |
|----------------------|-----------|------------|------------|--------|---------|---------|---------|---------|
| | 166,4 | 147,2 | 70,4 | 19,2 | 4,6 | 1,05 | 0,95 | 0,2 |
| | 243,2 | 192 | 102,4 | 25,6 | 6,4 | 0,9 | 0,9 | |
| | 281,6 | 204,8 | 102,4 | 25,6 | 4,8 | 0,8 | 0,6 | |
| | 256 | | | 19,2 | | | | |
| Conc medias μg/ml | 236,8 | 181,3 | 91,7 | 22,4 | 5,3 | 0,9 | 0,8 | 0,2 |
| Tiempos (min) | 5 | 15 | 30 | 60 | 120 | 240 | 360 | 480 |

Figura 7: Concentraciones de antibiótico obtenidas con la MDPA de amoxicilina en el suero de ratón.

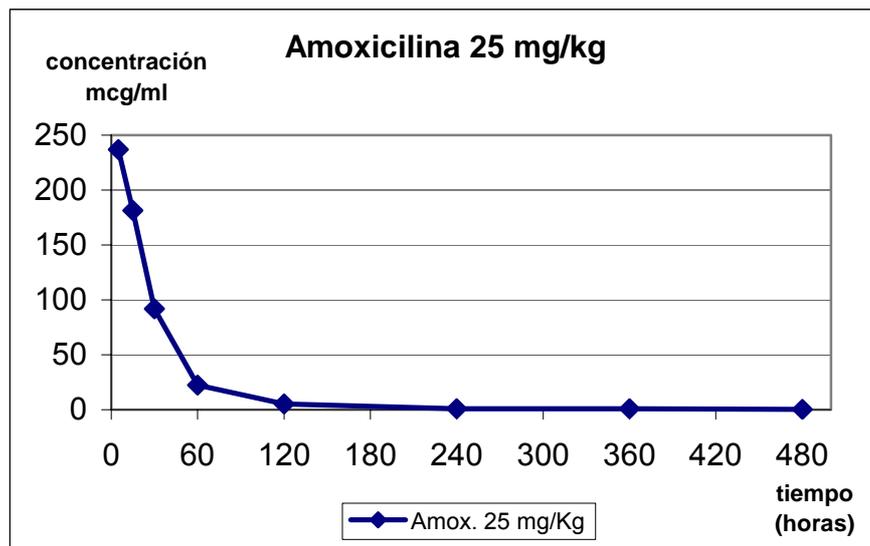


Figura 8: Curva patrón de cefotaxima

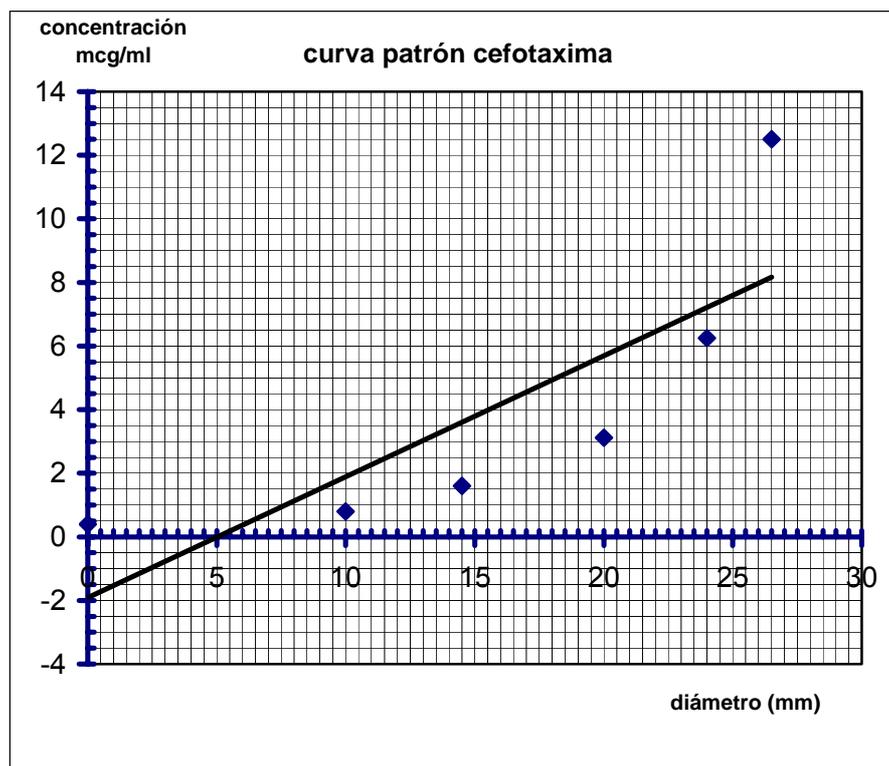


Tabla 10: Datos del diámetro de halo en milímetros y concentración de cefotaxima correspondiente.

| Curva patrón | |
|--------------|--------------------------------|
| Díametro | Concentración $\mu\text{g/ml}$ |
| 26,5 | 12,5 |
| 24 | 6,25 |
| 20 | 3,12 |
| 14,5 | 1,6 |
| 10 | 0,8 |
| 0 | 0,4 |

Tabla 11: Datos de las concentraciones de antibiótico obtenidas por la MDPA de cefotaxima (50mg/Kg) alcanzadas a cada tiempo tras extrapolar en la curva patrón.

| | 15 minutos | 30 minutos | 1 hora | 2 hora | 4 hora | 6 hora | 8 hora |
|-----------|------------|------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 5 minutos | 224 | 200 | 224 | 28 | 5,75 | 0 | 0 |
| | 416 | 256 | 320 | 46 | 8 | | |
| | 640 | 320 | 384 | 64 | 10 | | |
| | 576 | | 396 | 48 | | | |

| Conc medias $\mu\text{g/ml}$ | 464,0 | 258,7 | 331,0 | 46,5 | 7,9 | 0 | 0 | 0 |
|------------------------------|-------|-------|-------|------|-----|-----|-----|-----|
| Tiempos (min) | 5 | 15 | 30 | 60 | 120 | 240 | 360 | 480 |

Figura 9: Concentraciones de antibiótico obtenidas con la MDPA de cefotaxima en el suero de ratón.

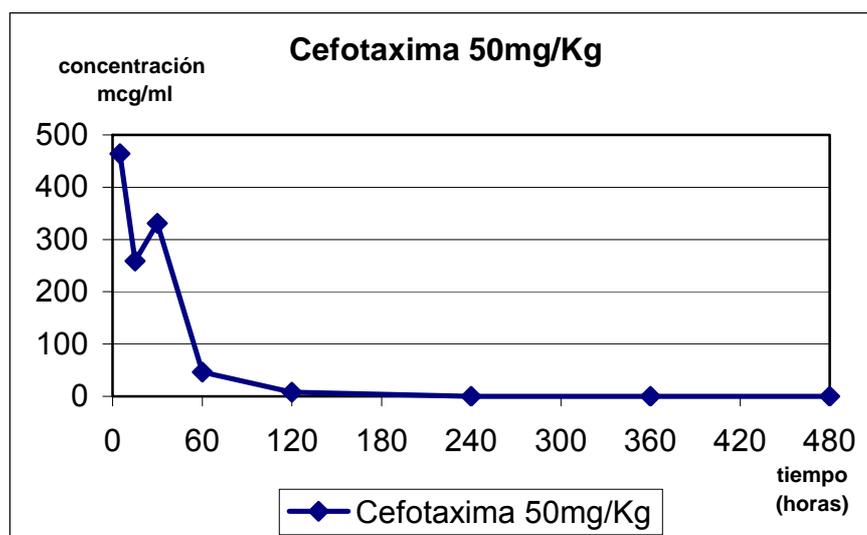


Tabla 12: Parámetros farmacodinámicos de la MDPA de amoxicilina y cefotaxima.

| | Cmax (mg/L) | AUC (mg/min/L) | $\Delta T > CMI$ min (% interval o dosis) | Cmax:CMI | AUC:CMI |
|------------------------|--------------------|-------------------|---|--------------|---------------|
| AMX 25 mg/ Kg | 270,6 | 7657,7 | 123 (25,6) | 67,6 | 1914,4 |
| CTX 50 mg/ Kg | 621,4 | 16483,8 | 156 (32,5) | 310,7 | 8241,9 |

5. ESTUDIOS DE TERAPIA COMBINADA

5.1 PRUEBAS DE PROTECCIÓN POR LA COMBINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS CON EL SUERO HIPERINMUNE EN EL MODELO MURINO DE SEPSIS

En total se realizaron 3 experimentos independientes de terapia combinada. El suero hiperinmune se utilizó en diluciones dobles desde 1/2 hasta 1/16 y el antibiótico desde 50 mg/Kg hasta 1,6 mg/Kg. Cada experimento incluía controles de antibiótico, suero, y dosis desafío. En la tabla (13) se indica el valor medio de protección obtenido en los tres

experimentos. La combinación que protegió al 100% de los animales fue AMX 3,12 mg/Kg + suero 1:4 y CTX 6,25 mg/kg + suero 1:4.

Tabla 13: % de supervivencia de los animales tratados con suero hiperinmune, terapia antibiótica y terapia combinada.

| DOSIS DE ANTIBIÓTICO (mg/kg) | DILUCIONES DECRECIENTES DE SUERO HIPERINMUNE | | | | |
|------------------------------|--|-----|-----|-----|------|
| | | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 |
| Placebo | 0 | 60 | 40 | 20 | 0 |
| Amoxicilina 1,6 | 0 | 60 | 80 | 40 | 0 |
| Amoxicilina 3,12 | 0 | 100 | 100 | 0 | 40 |
| Amoxicilina 6,25 | 0 | 100 | 100 | 60 | 40 |
| Amoxicilina 12,5 | 0 | 100 | 100 | 80 | 80 |
| Amoxicilina 25 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Amoxicilina 50 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Cefotaxima 1,6 | 0 | 60 | 80 | 80 | 60 |
| Cefotaxima 3,12 | 0 | 60 | 60 | 40 | 40 |
| Cefotaxima 6,25 | 0 | 100 | 100 | 20 | 0 |
| Cefotaxima 12,5 | 0 | 100 | 100 | 40 | 60 |
| Cefotaxima 25 | 20 | 100 | 100 | 60 | 100 |

| | | | | | |
|---------------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| Cefotaxima 50 | 80 | 100 | 100 | 100 | 100 |
|---------------|-----------|------------|------------|------------|------------|

5.2 NIVELES EN EL SUERO DE RATÓN DE LA MDPA OBTENIDA EN LA COMBINACIÓN

Una vez conocida la combinación DPS-MDPA que protegía al 100% de los animales, el siguiente objetivo fue determinar la concentración alcanzada en el suero de ratón por la fracción de antibiótico de dicha combinación. En el caso de AMX se estudió la dosis de 3,12 mg/Kg y en la CTX la de 6,25 mg/Kg. La metodología y los tiempos vienen reflejados en el apartado 5.2 de Materiales y Métodos. Se utilizaron lotes de 5 animales para cada tiempo de toma de muestra. Los resultados vienen reflejados en la figuras y tablas que se muestran a continuación:

La concentración máxima (Cmax) y el área bajo la curva (AUC) fueron 270,6 µg/ml y 7657,7 µg.min/ml y 6,1 µg/ml y 191,3 µg.min/ml para la MDPA de AMX sin (25 mg/Kg) y con (3,12 mg/Kg) suero hiperinmune (dilución 1/4) respectivamente. La Cmax y el AUC fueron 621,5 µg/ml y 16483,8 µg.min/ml y 25,3 µg/ml y 368,1 µg.min/ml para la MDPA de CTX sin (50 mg/Kg) y con (6,25 mg/Kg) suero hiperinmune (dilución 1/4) respectivamente. En la tabla (18) vienen reflejados los valores de los parámetros farmacodinámicos determinados para la MDPA con y sin inmunoprotección (dilución de suero 1/4).

La presencia de anticuerpos específicos disminuyó ocho veces la mínima dosis efectiva de AMX y CTX; 45, 9 y 40 veces la Cmax:CMI, $\Delta T > CMI$ y AUC:CMI respectivamente para AMX y 25, 6 y 44 veces respectivamente para CTX.

Figura 10: Curva patrón de amoxicilina.

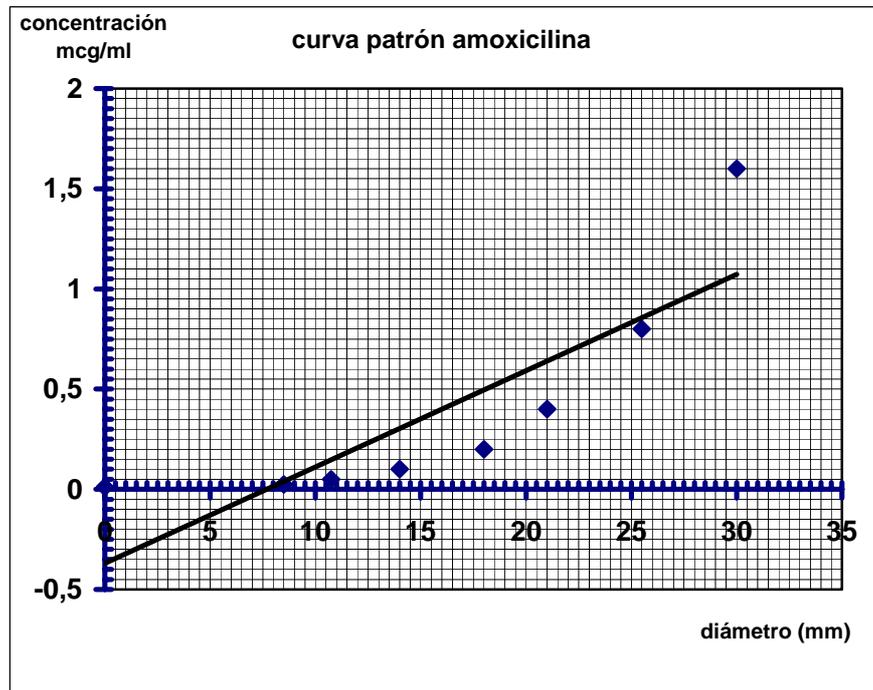


Tabla 14: Datos del diámetro de halo en milímetros y concentración de amoxicilina correspondiente.

Curva patrón

| Diametro | Concentración $\mu\text{g/ml}$ |
|----------|--------------------------------|
| 30 | 1,6 |
| 25,5 | 0,8 |
| 21 | 0,4 |
| 18 | 0,2 |
| 14 | 0,1 |
| 10,75 | 0,05 |
| 8,5 | 0,025 |

0

0,012

Tabla 15: Datos de las concentraciones de amoxicilina 3,12 mg/Kg alcanzadas a cada tiempo tras extrapolar en la curva patrón.

| | 5 minutos | 15 minutos | 30 minutos | 1 hora | 2 hora | 4 horas | 6 horas | 8 horas |
|----------------------|-----------|------------|------------|--------|--------|---------|---------|---------|
| | 1,05 | 0,95 | 1 | 0,6 | 0,05 | 0 | 0 | 0 |
| | 1,9 | 1,6 | 1,2 | 0,9 | | | | |
| | 3 | 2,6 | 2,2 | 1,4 | | | | |
| | 6 | 4,4 | 2,8 | 0,8 | | | | |
| | 8,8 | 6,4 | 3,2 | | | | | |
| | 11,2 | 9,6 | | | | | | |
| | | 3,2 | | | | | | |
| Conc medias µg/ml | 5,3 | 4,1 | 2,1 | 0,9 | 0,05 | 0 | 0 | 0 |
| Tiempos (min) | 5 | 15 | 30 | 60 | 120 | 240 | 360 | 480 |

Figura 11: Concentraciones de antibiótico obtenidas con la dosis de 3,12 mg/Kg de amoxicilina en el suero de ratón.

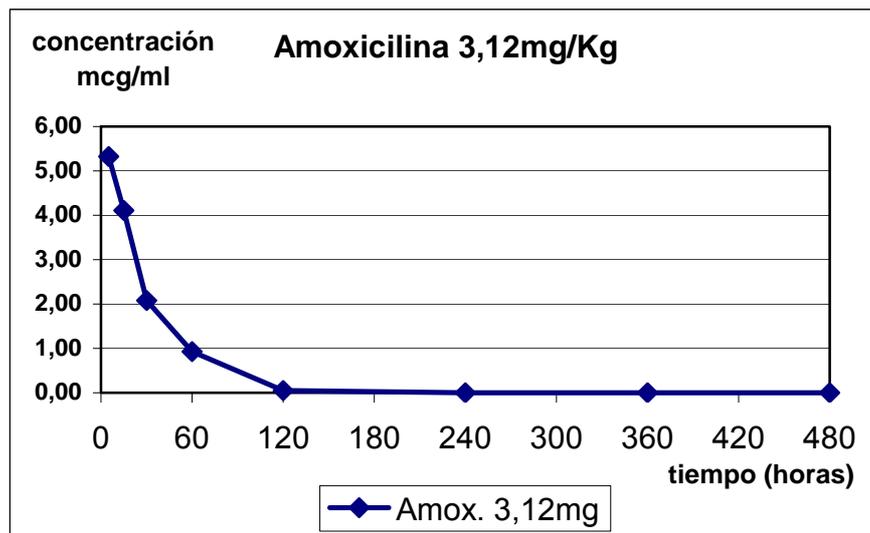


Figura 12: Curva patrón de cefotaxima

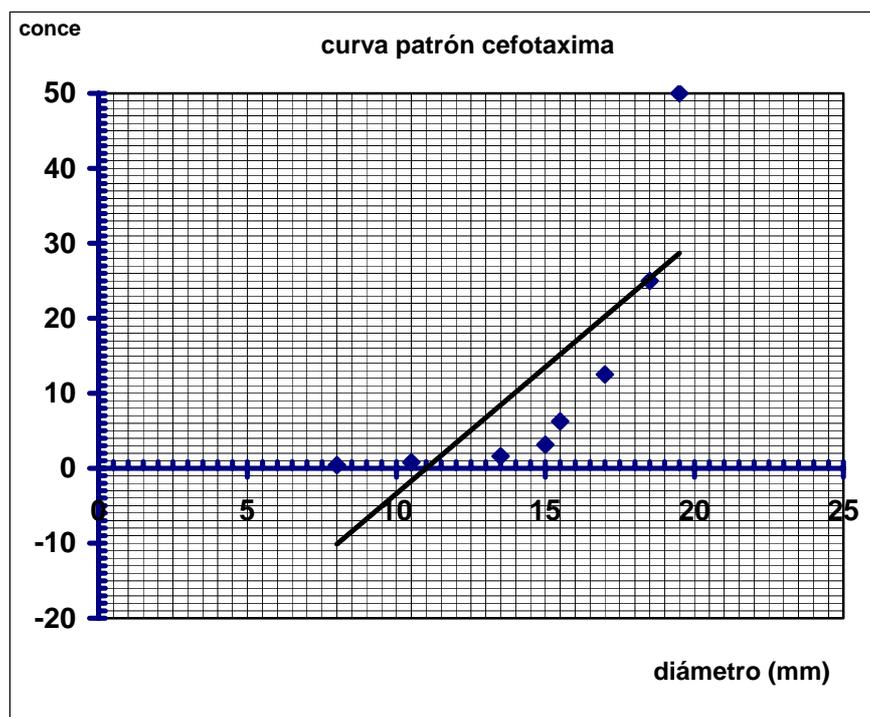


Tabla 16: Datos del diámetro de halo en milímetros y concentración de cefotaxima correspondiente.

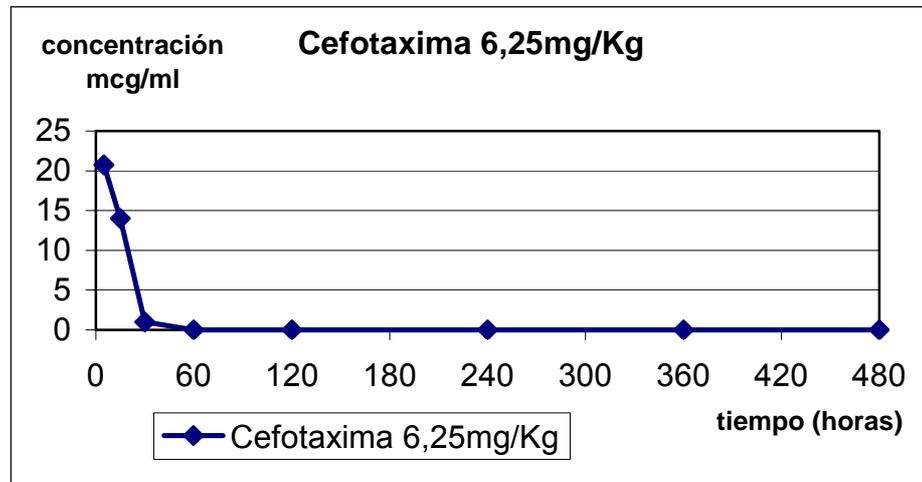
| Curva patrón | |
|--------------|--------------------------------|
| Diametro | Concentración $\mu\text{g/ml}$ |
| 19,5 | 50 |
| 18,5 | 25 |
| 17 | 12,5 |
| 15,5 | 6,25 |
| 15 | 3,12 |
| 13,5 | 1,6 |
| 10,5 | 0,8 |
| 8 | 0,4 |

Tabla 17: Datos de las concentraciones de cefotaxima 6,25 mg/Kg alcanzadas a cada tiempo tras extrapolar en la curva patrón.

| 5 minutos | 15 minutos | 30 minutos | 1 hora | 2 horas | 4 horas | 6 horas | 8 horas |
|-----------|------------|------------|--------|---------|---------|---------|---------|
| 13 | 13 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | 15 | | | | | | |
| 30 | | | | | | | |
| 24 | | | | | | | |

| Conc medias $\mu\text{g/ml}$ | 20,8 | 14,0 | 1,0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|------------------------------|------|------|-----|----|-----|-----|-----|-----|
| Tiempos (min) | 5 | 15 | 30 | 60 | 120 | 240 | 360 | 480 |

Figura 13: Concentraciones de antibiótico obtenidas con la dosis de 6,25 mg/Kg de cefotaxima en el suero de ratón.



Resultados

Tabla 18: Parámetros farmacodinámicos de la MDPA con y sin inmunoprotección. (AMX: amoxicilina. CTX: cefotaxima).

| | Mínima dosis efectiva (mg/Kg) | Cmax:CMI | $\Delta T > CMI$ min (% intervalo dosis) | AUC:CMI |
|-------------------------|-------------------------------|----------|--|---------|
| AMX | 25 | 67,6 | 123 (25,6) | 1914,4 |
| AMX + suero hiperinmune | 3,12 | 1,5 | 13,6 (2,8) | 47,8 |
| CTX | 50 | 310,7 | 156 (32,5) | 8241,9 |
| CTX + suero hiperinmune | 6,25 | 12,6 | 26 (5,4) | 184,0 |

Resultados

5.3 TERAPIA COMBINADA CONJUNTA

En los experimentos de terapia combinada realizados anteriormente, la administración del antibiótico se realizó dos horas después de la administración del suero hiperinmune. En este experimento el objetivo era conocer la protección obtenida al administrar conjuntamente el antibiótico (AMX 3,12mg/Kg) y el suero hiperinmune (suero diluido al 1/4) una hora después de la dosis desafío de neumococo (1-2 veces la DL_{100}). El seguimiento de los animales se hizo durante dos semanas anotando la muerte o supervivencia así como el estado de salud de los ratones. Los controles que no llevaban suero hiperinmune (control de letalidad y control de antibiótico) fueron inoculados una hora después del neumococo con 200 μ l de suero no inmune, para confirmar que la administración de suero no inmune y antibióticos no confería ningún tipo de protección. La metodología viene reflejada en el apartado 5.3 de Materiales y Métodos. Este experimento se realizó con AMX y no con CTX debido a que en los estudios realizados anteriormente, la AMX presentó niveles totalmente protectores con menores dosis de antibiótico en presencia o ausencia de suero.

En la tabla 19 se muestran los resultados de este experimento.

Todos los animales del grupo control murieron en las primeras 48 horas, al igual que los animales del grupo de AMX 3,12 mg/Kg. También murieron todos los animales que recibieron seroterapia (suero inmune diluido al 1/4) pero lo hicieron a lo largo de los primeros 11 días de seguimiento, mientras que sobrevivió el 60% en el grupo de los animales de terapia combinada.

Resultados

Tabla 19: Porcentaje de supervivencia de los ratones en el grupo control y en los diferentes grupos de tratamiento a lo largo de los 14 días de seguimiento.

| Tratamiento (grupo) | % de Supervivencia | | | | | | | |
|---|--------------------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-------|
| | DÍA 1 | DÍA 2 | DÍA 3 | DÍA 4 | DÍA 5 | DÍA 10 | DÍA 11 | DÍA14 |
| Control (suero no inmune) | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AMX 3,12 mg/Kg + suero no inmune | 80 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Suero hiperinmun | 100 | 100 | 80 | 80 | 20 | 20 | 0 | 0 |

Resultados

| | | | | | | | | | |
|---|-----|-----|-----|----|----|----|----|----|--|
| e | | | | | | | | | |
| AMX 3,12 mg/Kg + suero hiperinmun e | 100 | 100 | 100 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | |

Resultados

6. PERFILES BACTERIÉMICOS

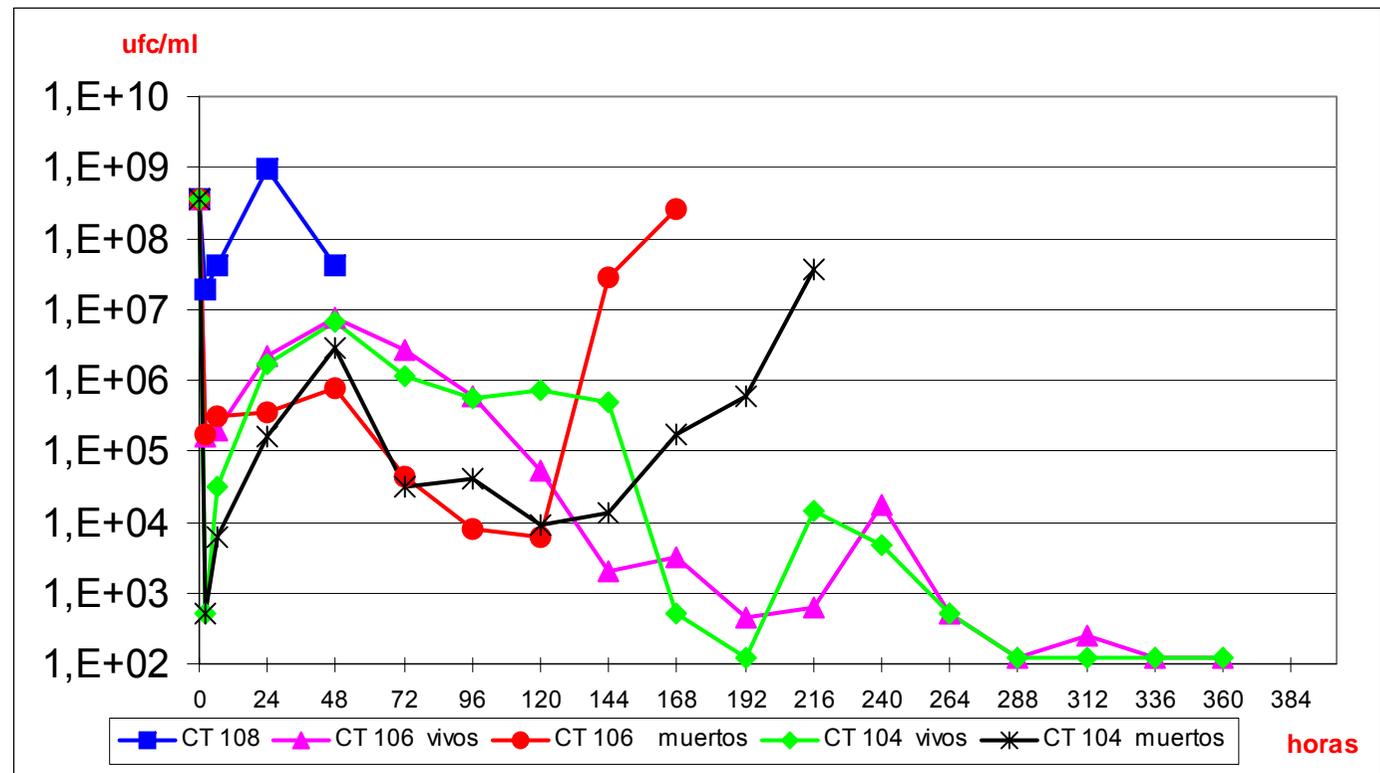
6.1 PERFIL BACTERIÉMICO TRAS LA INOCULACIÓN DE LA CEPA DE NEUMOCOCO 1515/97 ST 6B.

En la figura 14 se representan las concentraciones bacterianas alcanzadas en sangre a los diferentes tiempos de toma de muestra. El seguimiento de los animales se hizo durante 15 días hasta la eliminación total de la bacteria en sangre o la muerte de los animales.

Todos los animales inoculados con la dosis 10^8 UFC/ml murieron en las primeras 48h, alcanzando concentraciones en sangre por encima de 10^8 UFC/ml desde las 6 horas siguientes a la inoculación y manteniéndose por encima de esta concentración hasta la muerte de todos los animales. El 80% de los ratones murió con esta concentración en las primeras 24h mientras que el 20% restante (1 ratón) lo hizo en las siguientes 24h. Este experimento se realizó en paralelo con el de determinación de los perfiles de suero hiperinmune (apartado 6.2 de Resultados), de modo que el perfil bacteriémico del grupo de 10^8 UFC/ml se utilizó como grupo control de muerte en el apartado 6.2 de Resultados. Los perfiles bacteriémicos de las dosis 10^6 y 10^4 UFC/ml fueron similares entre sí, alcanzando concentraciones por encima de 10^6 UFC/ml desde las primeras 24 horas, manteniéndose esta concentración hasta el día 4 (96h). A partir de entonces, se produjo una reducción progresiva de la bacteriemia en sangre como puede apreciarse en la figura (14) hasta su desaparición definitiva a partir del día 12 (288h). Un ratón de cada grupo murió (20%). Estas muertes se produjeron los días 7 para el inóculo de 10^6 UFC/ml y 9 para el inóculo de 10^4 UFC/ml. El perfil bacteriémico de estos dos animales fue también muy similar.

Resultados

Figura 14: Perfil bacteriémico a lo largo de 360h de seguimiento después de inoculaciones IP de 10^4 , 10^6 , 10^8 UFC/ml de la cepa 1515/97.



Resultados

6.2 PERFIL BACTERIÉMICO TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE SUERO HIPERINMUNE.

En la tabla (20) se representa la supervivencia a lo largo de los días de seguimiento. Los animales del grupo control murieron en las primeras 48 horas, cuatro ratones en las primeras 24 h y el quinto ratón al día siguiente.

Con suero diluido al 1/16 murieron todos los animales. El primero a las 24 h, tres ratones en la hora 48 y el último a las 144 h.

Los animales que recibieron suero no diluido (puro) y murieron (60%), lo hicieron a las 96, 120 y 336 horas. En los ratones que recibieron suero diluido al 1/4 y murieron (60%), la muerte sucedió a las 24, 120 y 360 horas.

Los perfiles bacteriémicos vienen reflejados en las figuras (15 y 16) En la dilución al 1/16, el perfil bacteriémico fue similar al de los animales del grupo control. Debido a que los recuentos fueron muy similares se representa la media en cada grupo.

En el perfil bacteriémico de los animales que recibieron protección con suero puro o 1/4 y murieron, la bacteriemia se mantuvo entre 10^{6-8} UFC/ml durante el periodo 24h a 120h con la excepción de un ratón. Todos los animales que murieron tuvieron al menos un recuento de colonias en sangre $\geq 10^7$ UFC/ml en el periodo 24h a 48h, y recuentos de colonias en sangre $\geq 10^8$ UFC/ml en los momentos cercanos a la muerte.

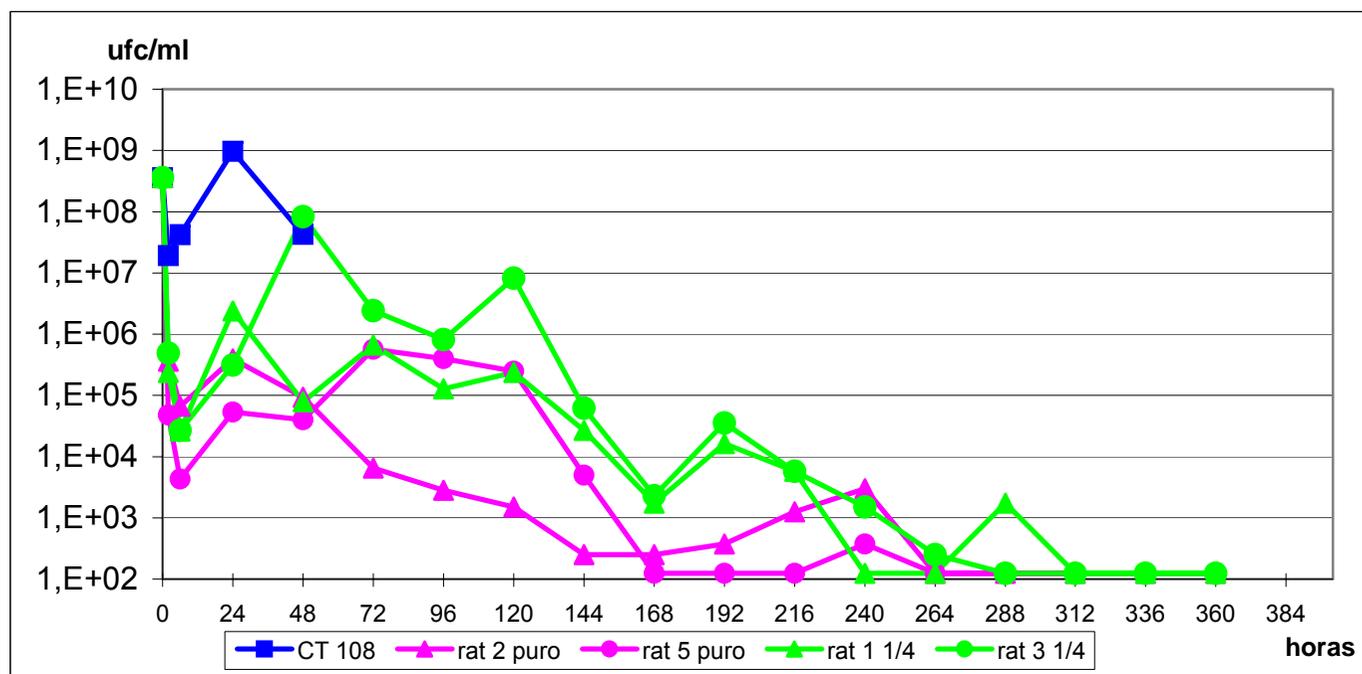
En los animales que sobrevivieron tras la protección por suero, la bacteriemia fue inferior a 10^6 UFC/ml. Estos niveles fueron decreciendo hasta su desaparición en el día 13.

Tabla 20: Porcentajes de supervivencia a lo largo de 15 días en animales que recibieron placebo (control), suero hiperinmune diluido 1/4, al 1/16 y no diluido (puro).

| % SUPERVIVENCIA | | | | | | | | | |
|-----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----|--------|--------|
| | 2 | 4 | 7 | 9 | 1 | 1 | ... | 3 | 3 |
| | 4 | 8 | 2 | 6 | 2 | 4 | ... | 3 | 6 |
| | h | h | h | h | 0 | 4 | ... | 6 | 0 |
| | | | | | h | h | ... | h | h |
| | | | | | | | . | | |
| Grupo control | 2 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 |
| Suero 1/16 | 8 0 | 2 0 | 2 0 | 2 0 | 2 0 | 0 | | 0 | 0 |
| Suero 1/4 | 8 0 | 8 0 | 8 0 | 8 0 | 6 0 | 6 0 | | 6 0 | 4 0 |

| | | | | | | | | |
|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Suero no | 1 | 1 | 1 | 8 | 6 | 6 | 4 | 4 |
| diluido | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 0 | 0 | 0 | | | | | |

Figura 16: Perfil bacteriémico de los animales supervivientes tras la administración de suero no diluido o diluido 1/4.



Resultados

6.3 PERFIL BACTERIÉMICO DE LOS ANIMALES TRATADOS CON LOS ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS DEL ESTUDIO.

El seguimiento de los animales se hizo durante 15 días hasta la eliminación final de la bacteria en sangre o la muerte de los mismos. En la tabla (21) se representa la supervivencia de los animales. Las dosis de antibiótico inoculadas oscilaron desde 100 mg/kg hasta 6,25 mg/Kg. Con AMX se obtuvo un 100% de protección para las dosis de 100, 50 y 25 mg/Kg, un 40% para la concentración de 12,5 mg/Kg, no sobreviviendo ningún animal con la dosis de 6,25 mg/Kg. Los tres animales que murieron con la dosis de 12,5 mg/Kg lo hicieron a las 96 horas (1 ratón) y a la hora 144 (2 ratones). Con la dosis de 6,25mg/Kg los ratones murieron a las 48 h (2 ratones) y 72 h (3 ratones).

La protección con el antibiótico CTX fue del 100% con la dosis de 100 mg/Kg y del 60% para la dosis de 50 mg/Kg. Con el resto de concentraciones no sobrevivió ningún animal. Los dos animales que murieron del grupo de 50 mg/Kg lo hicieron a las 120 y 144 horas. Los animales del grupo de 25 mg/kg murieron a las 24 horas (1 ratón), 72 horas (2 ratones) y 120 horas (2 ratones).

Los animales inoculados con la dosis de 12,5 mg/Kg murieron a las 48, 72 (2 ratones), 96 y 144 horas. Los animales del grupo de 6,25 mg/Kg murieron a las 24, 48 (3 ratones) y 96 horas.

El perfil bacteriémico de los animales que sobrevivieron se mantuvo igual o por debajo de 10^6 UFC/ml durante el periodo del estudio. Por el contrario se encontraron recuentos bacterianos $> 10^6$ UFC/ml durante las primeras 144 h en los animales que murieron. Esto puede verse claramente en el grupo de amoxicilina 12,5 mg/kg y cefotaxima 50 mg/kg en los que algunos animales sobrevivieron y otros murieron. Los perfiles bacteriémicos vienen reflejados en las figuras (17 y 18).

mg/K

g

AMX

100

100

100

100

100

100

100

100

100

mg/K

g

CTX

80

20

20

0

0

0

0

0

6,25

mg/K

g

CTX

100

80

40

20

20

0

0

0

12,5

mg/K

g

CTX

80

80

40

40

0

0

0

0

25

mg/K

g

CTX

100

100

100

100

80

60

60

60

50

mg/K

g

| | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| CTX | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 100 | | | | | | | | | |
| mg/K | | | | | | | | | |
| g | | | | | | | | | |

Figura 17: Perfiles bacteriémicos de los animales tratados con diferentes dosis de amoxicilina

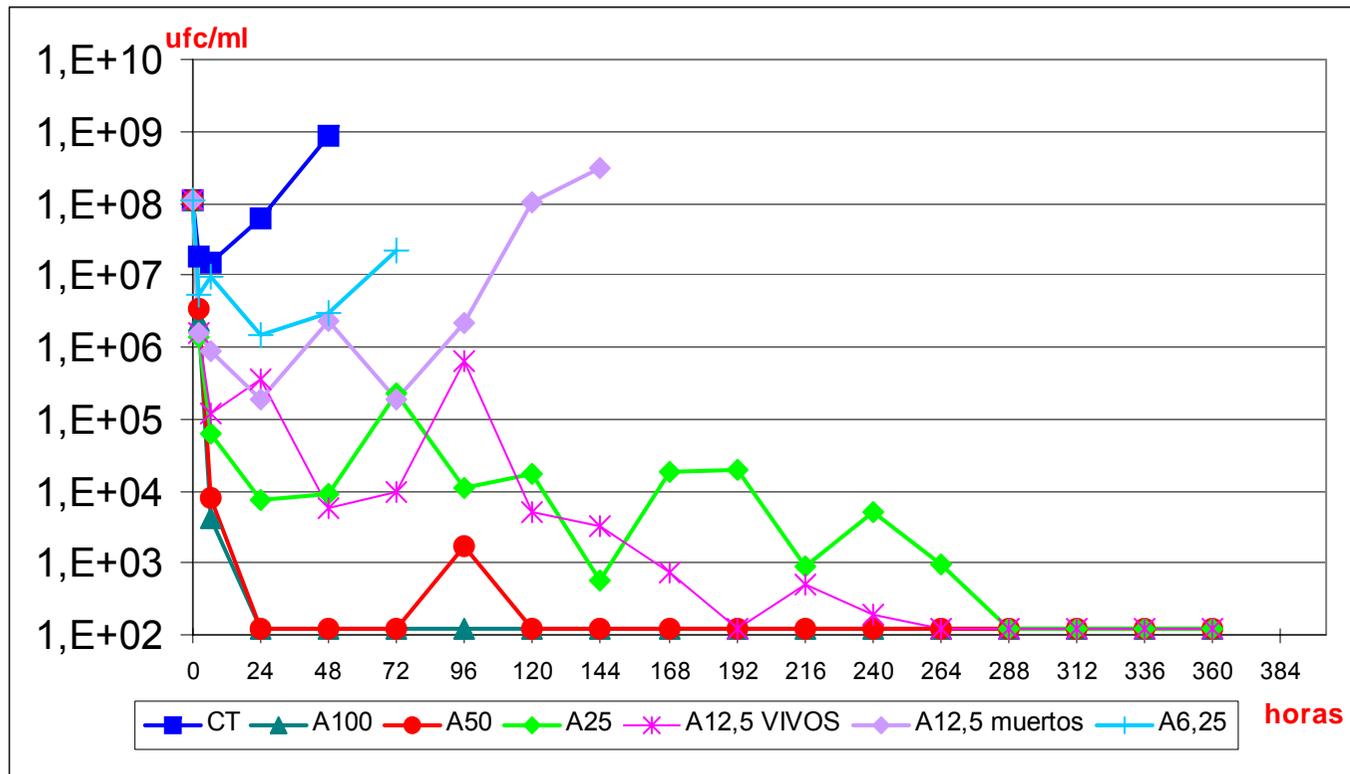
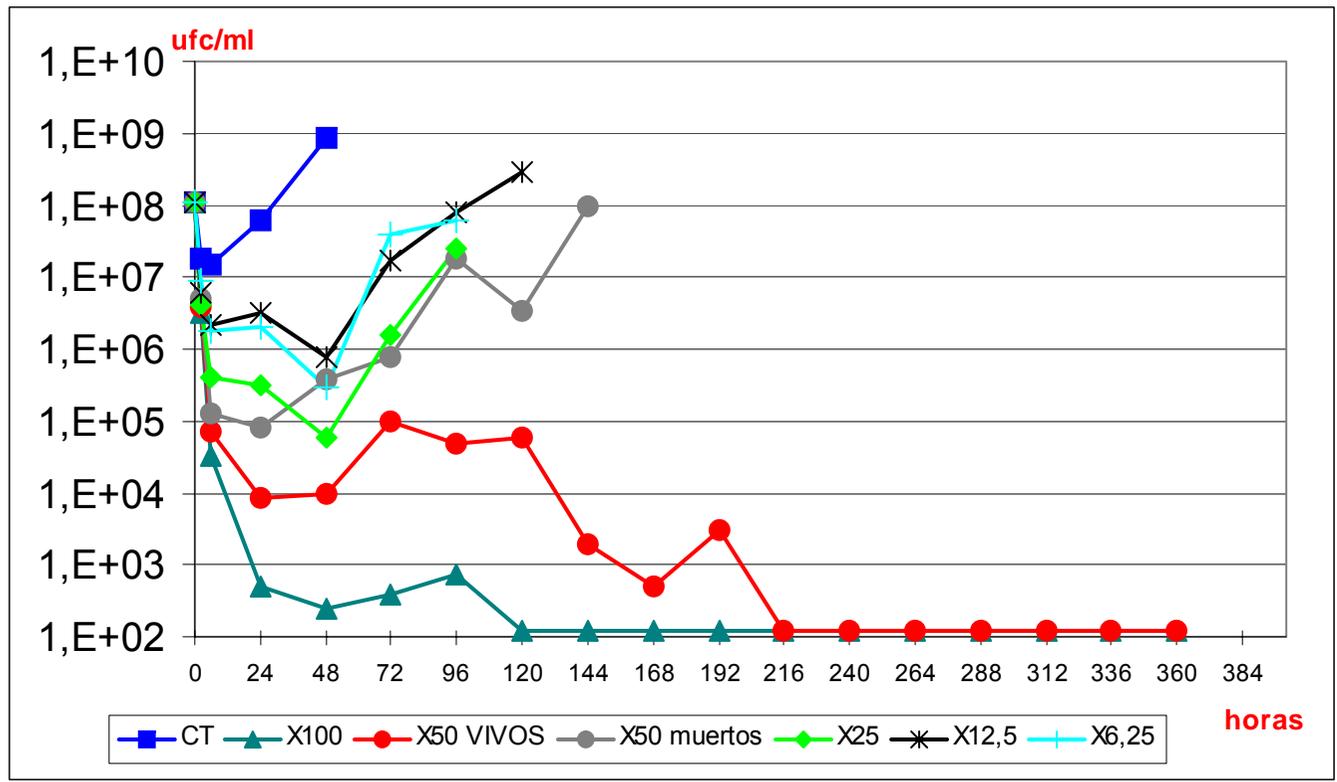


Figura 18: Perfiles bacteriémicos de los animales tratados con diferentes dosis de cefotaxima.



6.4 PERFIL BACTERIÉMICO DE LA COMBINACIÓN MDPS-MDPA.

El estudio finalizó cuando no se detectó bacteria en ninguno de los animales supervivientes. En la tabla (22) se representan las tasas de supervivencia a lo largo del periodo de seguimiento. Todos los animales del grupo control de la dosis desafío, murieron (3 ratones a las 24 h, 1 ratón a las 48 y 72 horas). Con la dosis de 3,12 mg/Kg murieron todos los animales (80% a las 48 horas y el último ratón a las 120h).

La supervivencia de los animales que recibieron suero 1/4 fue del 60% (1 ratón a las 192 h y otro a las 264 h). En la dilución 1/8 de suero se obtuvo un 40% de protección (2 ratones muertos a las 48 horas y otro a las 144 h).

En la terapia combinada, únicamente sobrevivió el 100% de los animales del grupo suero 1/4 y AMX 3,12 mg/Kg. Con suero 1/8 y AMX 3,12 mg/Kg sobrevivió el 40% (2 ratones muertos a las 144 h y el tercer ratón a las 216 h). En el grupo inoculado con AMX 3,12 mg/Kg y suero 1/16, sobrevivió un animal (20%) muriendo el resto de los animales a las 120 horas (2 ratones) 144 horas y 240 horas.

En las figuras (19, 20 y 21) se representan los perfiles bacteriémicos de todos los grupos analizados. Como puede observarse en las gráficas de los perfiles bacteriémicos, recuentos $\geq 10^7$ UFC/ml se correlacionaron con muerte de los animales (animales del grupo control de letalidad, animales tratados con AMX y los del grupo de seroprotección) mientras que los animales que sobrevivieron tuvieron recuentos bacterianos $< 10^7$ UFC/ml a lo largo del periodo de seguimiento. La desaparición de la bacteriemia ocurrió antes en los animales que recibieron terapia combinada.

Tabla 22: Porcentajes de supervivencia a lo largo de los días de seguimiento.

| % SUPERVIVENCIA | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|-----|-----|----------------|------|------------------|----------|-----|----------|----------|-------|-----|
| | 24h | 48h | 72- 96 h | 120h | 144- 168 h | 192 h | 216 | 240 h | 264 h | | 504 |
| Grupo control | 40 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0 |
| Amoxicilina 3,12 mg/kg | 100 | 20 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0 |
| Suero 1/4 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 80 | 80 | 80 | 60 | | 60 |
| Suero 1/8 | 100 | 60 | 60 | 60 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | | 40 |
| Suero 1/16 | 100 | 60 | 60 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0 |
| AMX 3,12 mg/kg + suero 1/4 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | | 100 |
| AMX 3,12 mg/kg + suero 1/8 | 100 | 100 | 100 | 100 | 60 | 60 | 40 | 40 | 40 | | 40 |

| | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|-----|-----|-----|----|----|----|----|----|----|--|----|
| AMX 3,12 mg/kg + suero 1/16 | 100 | 100 | 100 | 60 | 40 | 40 | 40 | 20 | 20 | | 20 |
|--------------------------------|-----|-----|-----|----|----|----|----|----|----|--|----|

Figura 19: Perfil bacteriémico de los animales de los grupos control de muerte, amoxicilina 3,12 mg/Kg, suero 1/4 vivos, suero 1/4 muertos, amoxicilina + suero 1/4.

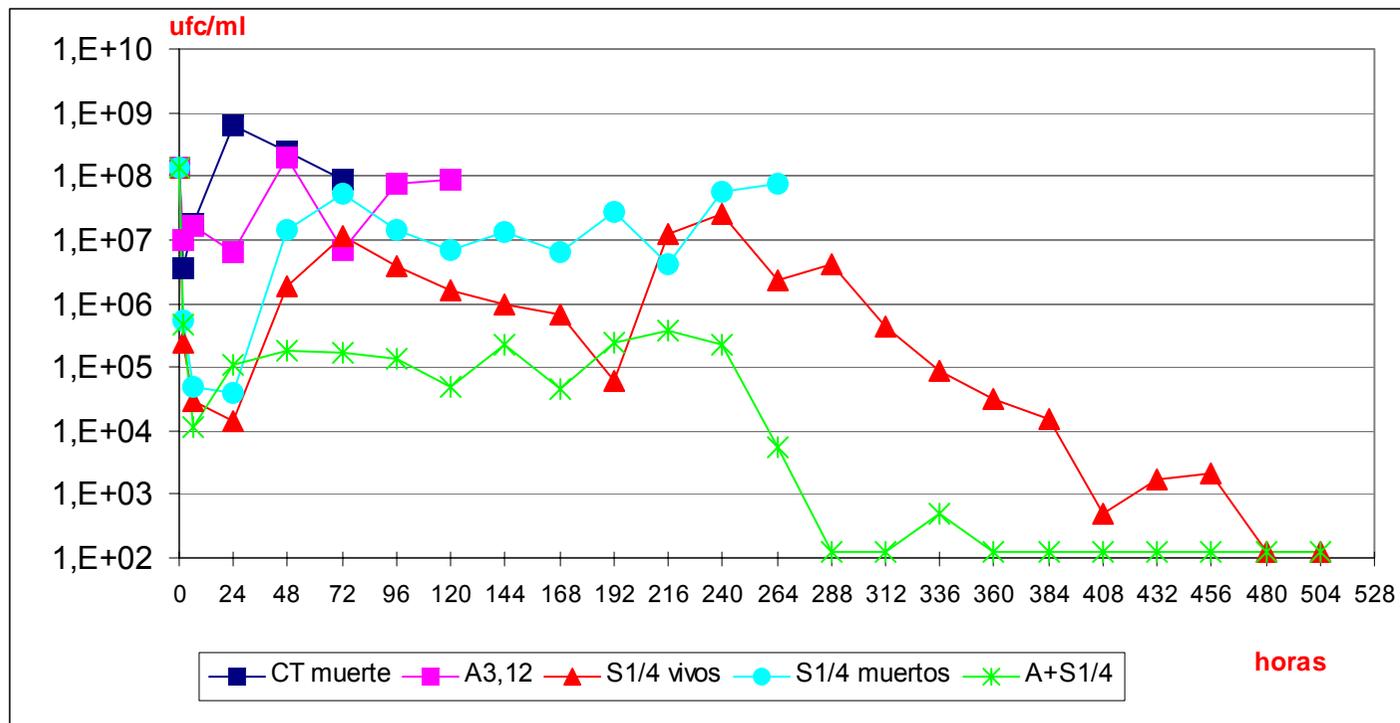


Figura 20: Perfil bacteriémico de los animales control de muerte, amoxicilina 3,12 mg/Kg, suero 1/8 vivos, suero 1/8 muertos, amoxicilina + suero 1/8 vivos y amoxicilina + suero 1/8 muertos.

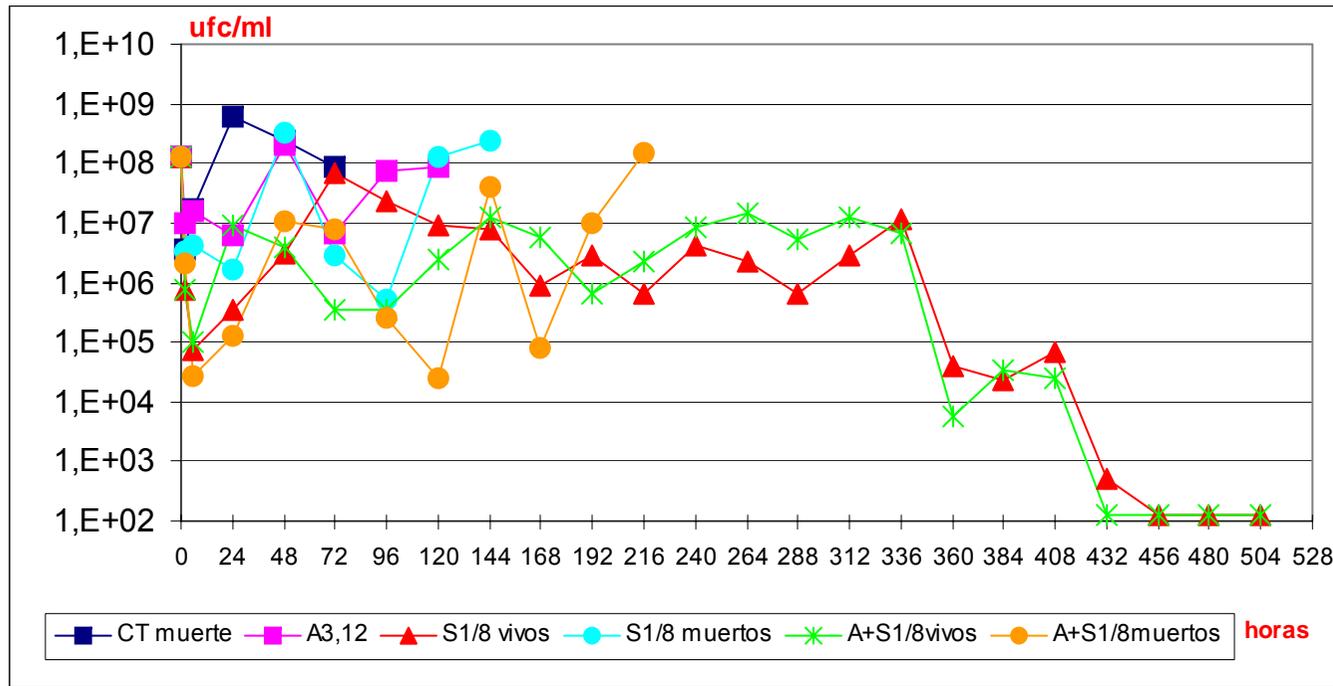
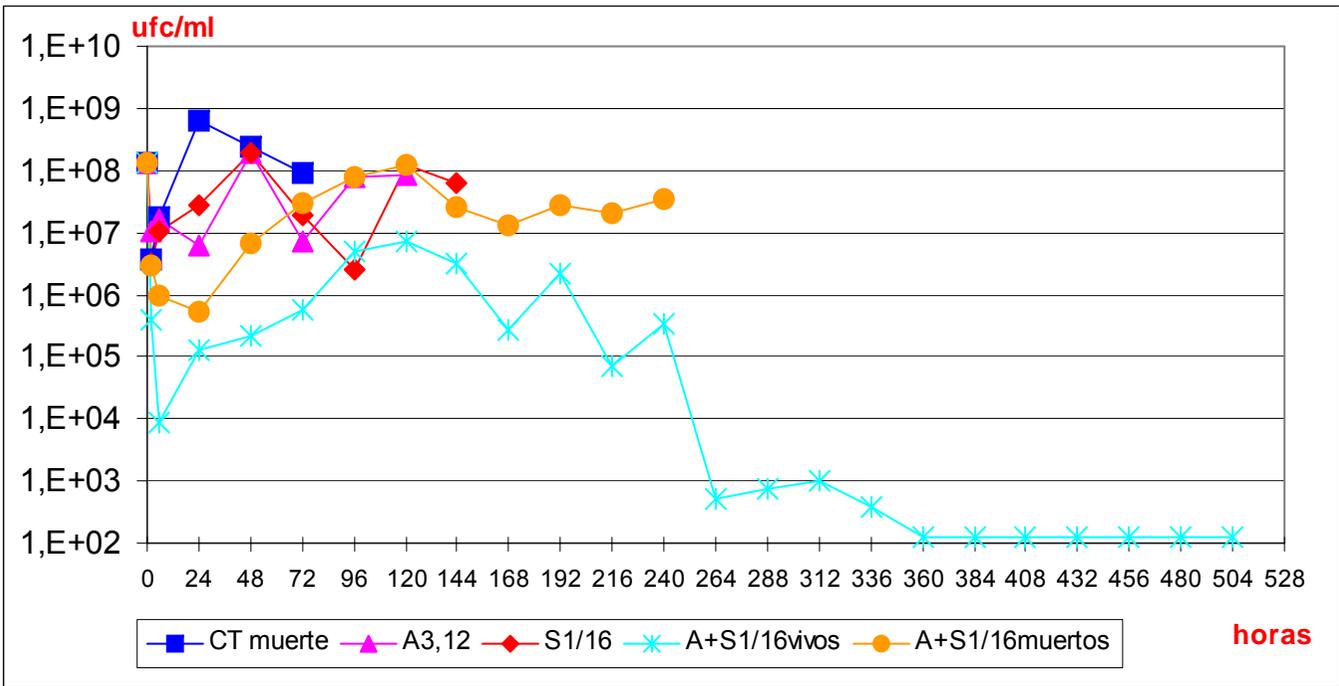


Figura 21: Perfiles bacteriémicos de los animales grupo control de muerte, amoxicilina 3,12 mg/Kg, suero 1/16, amoxicilina + suero 1/16 vivos, amoxicilina + suero 1/16 muertos



V. DISCUSIÓN

La búsqueda de tratamientos efectivos en la lucha contra las enfermedades infecciosas ha sido, desde hace muchos años, uno de los principales retos del hombre. Hasta que no se descubrieron los antibióticos, se disponía de pocas armas para combatir los agentes infecciosos. En la última década del siglo XIX se utilizaron terapias basadas en anticuerpos para tratar las infecciones (Casadevall 1996), así en los años veinte, la seroterapia se utilizó frente a numerosas infecciones bacterianas incluyendo las producidas por *Streptococcus pneumoniae* (Casadevall y Scharff 1995), reduciendo la mortalidad por este patógeno en un 50% (Casadevall y Scharff 1994). Sin embargo, cuando apareció la quimioterapia antibiótica a mediados de 1930, la terapia por anticuerpos fue abandonada, sustituyéndose por el tratamiento antibiótico debido a su mayor efectividad y menor toxicidad, apareciendo numerosos antimicrobianos a partir de ese momento.

El descubrimiento de las sulfamidas y la penicilina fueron grandes avances en este sentido. En el caso de las infecciones producidas por *Streptococcus pneumoniae* la eficacia de la penicilina fue notable ya que todas las cepas aisladas eran susceptibles a este fármaco. Sin embargo con el transcurso de los años la situación ha ido cambiando paulatinamente, detectándose ya en los años 60 las primeras cepas con susceptibilidad disminuida a la penicilina (Kislak y cols, 1965; Hansman y Bullen, 1967). A partir de entonces su número ha ido aumentando progresivamente y se han extendido por todo el mundo, aunque su incidencia varía de unas zonas a otras (Klugman, 1990; Dowson y cols, 1994).

España fue uno de los países donde se estudiaron por primera vez los niveles y porcentajes de cepas resistentes a penicilina a nivel poblacional (Casal, 1982). La situación se ha agravado desde entonces debido a la aparición de cepas resistentes no sólo a este antibiótico sino también a otros grupos de antibióticos, presentando diferentes patrones de multiresistencia (Fenoll y cols 1998). Todo lo anteriormente expuesto hace que el fenómeno de resistencia sea considerado un problema que aunque aún no presenta implicaciones clínicas alarmantes, potencialmente podría agravarse, de modo que en los últimos años ha surgido un interés generalizado en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas. En esta línea podemos encuadrar la investigación y diseño de las vacunas antineumocócicas (Smit y cols 1977). En la actualidad hay comercializadas dos tipos: una vacuna 23-valente de naturaleza polisacáridica que engloba los 23 serotipos más frecuentes y una vacuna heptavalente conjugada al toxoide diftérico CRM 197 (Eskola y Antilla, 1999).

La eficacia de las armas terapéuticas y preventivas actuales se complica con los problemas de inmunosupresión, malnutrición, SIDA, trasplantes de órganos, terapias médicas frente al cáncer y frente a enfermedades autoinmunes etc. En este sentido el estudio de las interacciones entre el sistema

inmune y los antibióticos puede ser un campo de investigación prometedor para entender mecanismos que hagan más eficaces los tratamientos antibióticos y poder superar el problema de su resistencia. Siguiendo esta línea se decidió poner a punto un modelo experimental de sepsis neumocócica para analizar la interacción de estos elementos en la infección producida por *Streptococcus pneumoniae* y contestar así a las preguntas que nos formulamos en los Objetivos de esta tesis.

El primer paso fue seleccionar una cepa resistente a los dos antimicrobianos del estudio perteneciente a un serotipo frecuente en patología y que además fuese virulenta en los ratones Balb/c utilizados en este trabajo. En neumococo existe una relación entre el tipo de cápsula de las cepas y la virulencia que producen en ratones (Briles y cols, 1992). Las cepas pertenecientes a los serotipos 14, 19 y 23 son avirulentas en ratones Balb/c mientras que aproximadamente el 60% de las cepas de los serotipos 6A y 6B son virulentas. Azoulay-Dupuis y cols 2000 confirman estos resultados y describen la posible relación inversa entre virulencia y susceptibilidad a penicilina en algunos aislados clínicos de *S. pneumoniae*. Las cepas resistentes a penicilina eran menos virulentas para los ratones, sugiriendo que la adquisición de resistencia podría llevar como “coste” asociado la disminución de la capacidad de producir daño en el hospedador. Recientemente, Rieux y cols 2001 han demostrado la existencia de una compleja relación entre adquisición de resistencia a B-lactámicos y pérdida de virulencia en *S. pneumoniae*. Para ello obtuvieron mutantes transformando una cepa de serotipo 6B (Peni-S y virulenta) con los genes *pbp2b* y *pbpX* procedentes de una cepa de serotipo 19 (Peni-R y avirulenta), encontrando una disminución en la virulencia de esos mutantes en un modelo murino de peritonitis. De estos trabajos se puede deducir la dificultad que existe para seleccionar cepas resistentes y virulentas en ratones, ya que el 85% de los neumococos con resistencia a penicilina pertenecen a sólo cinco serotipos: 6, 9, 14, 19 y 23 (Fenoll y cols 2000) y exceptuando el ST 6, todos presentan una baja o ninguna virulencia de las cepas.

Los estudios de virulencia que realizamos inicialmente en nuestro trabajo confirmaron los resultados obtenidos por Briles y Azoulay-Dupuis. Ninguna de las cepas estudiadas de los serotipos 9, 14, 19 y 23 fueron capaces de producir la muerte de los ratones. Respecto al ST 6B solamente el 13% de los aislados analizados fueron virulentos. Las diferencias entre este porcentaje y el de los autores antes señalados podrían deberse al vehículo del inóculo. En los otros trabajos la bacteria se resuspendía e inoculaba en el caldo de cultivo mientras que en nuestro estudio lo hicimos en solución salina para evitar posibles interacciones de los componentes del caldo con el sistema inmunológico del animal que pudieran sesgar los resultados obtenidos cuando administrásemos los antibióticos. Estas variaciones de virulencia en función del vehículo del inóculo ya fueron descritas por Briles y cols

1992, Frimodt-Moller y Thomsen 1986, quienes sugieren que la multiplicación bacteriana en el peritoneo del ratón, sucedería con mayor rapidez y en mayor grado si el microorganismo se inocula en caldo de cultivo en lugar de solución salina debido a que las células se conservan mejor (evitando su lisis) y a que las proteínas del caldo podrían comprometer las defensas del hospedador.

Para evaluar la eficacia de los antimicrobianos amoxicilina y cefotaxima, realizamos experimentos de curvas de muerte con la cepa seleccionada de serotipo 6B (1515/97). La máxima actividad bactericida fue obtenida con concentraciones de amoxicilina y cefotaxima ≥ 2 veces la CMI reduciéndose el inóculo inicial hasta 6,14 Log UFC/ml y 5,05 Log UFC/ml al cabo de las 9 horas de incubación, respectivamente (figuras 3 y 4 pag 54 y 55). La amoxicilina presentó una reducción del inóculo inicial diez veces mayor que la cefotaxima. Estos resultados coincidieron con los obtenidos por Chavanet y cols 1998, en un estudio en el que analizaron la actividad de amoxicilina y ceftriaxona en 4 cepas de neumococo con susceptibilidad disminuida a la penicilina. En este estudio, la amoxicilina siempre produjo una reducción del inóculo inicial hasta diez veces mayor que la cefalosporina. Pérez-Trallero y cols 1998 también encontraron una mayor reducción del inóculo inicial con amoxicilina que con cefuroxima y cefpodoxima en una cepa de neumococo resistente a penicilina.

Se han descrito una serie de parámetros farmacodinámicos que permiten conocer la actividad bactericida de los antibióticos (Craig 1998). La CMI y CMB son capaces de cuantificar la actividad de un antimicrobiano frente al patógeno infeccioso pero no dan información sobre si la actividad bactericida puede mejorarse al incrementar la concentración de fármaco o si el efecto inhibitor persistirá mucho tiempo tras la exposición a la droga. El PAE (efecto postantibiótico), el PAE-SME (efecto postantibiótico sub-CMI) y el PALE (aumento leucocitario postantibiótico) son parámetros farmacodinámicos que a diferencia de la CMI / CMB si permiten determinar las propiedades anteriormente mencionadas. Spangler y cols 1997, observaron en experimentos de PAE y PAE-SME con neumococos resistentes a penicilina, que la muerte del neumococo podría deberse a una lisis extremadamente rápida inducida por los antibióticos durante el período de exposición PAE. En este estudio la amoxicilina mostró mayor PAE que la ceftriaxona. Esto podría explicar por qué en nuestros experimentos de actividad bactericida la amoxicilina mostró mayores reducciones del inóculo inicial que la cefotaxima.

Una vez que conocimos el comportamiento “in vitro” de los antibióticos del estudio frente a la cepa de ST 6B seleccionada, el siguiente paso fue obtener el suero hiperinmune. La mayoría de los polisacáridos capsulares bacterianos son pobremente inmunogénicos cuando se inoculan en animales y por tanto producen niveles bajos de anticuerpos (Lee y cols, 1987) aunque la respuesta puede

mejorarse si se conjugan a proteínas (Paton y cols 1991 y Alexander y cols 1994) debido a que los polisacáridos capsulares son antígenos timo independientes y por tanto no inducen memoria inmunológica, pero al conjugarse a proteínas se solventa ese problema ya que estos antígenos se transforman en timo dependientes.

El mecanismo de regulación de la respuesta inmunológica es otro de los parámetros que parecen influir en los niveles de anticuerpos. Se ha visto que está regulada por dos subtipos de linfocitos T (Ts: supresor y Ta: amplificador). Baker en 1992, estudió en ratones la magnitud en la respuesta de anticuerpos al polisacárido capsular de tipo 3 de *S. pneumoniae* observando que la edad óptima en los ratones se alcanza entre las 6-8 semanas de edad, período en el que la actividad de Ta alcanza el máximo nivel. Estos resultados coinciden con los de Borghesi y Nicoletti 1995 que estudiaron la respuesta primaria y secundaria a antígenos bacterianos en ratones Balb/c de diferente edad. Los ratones jóvenes (3-4 meses) tuvieron mayores niveles de anticuerpos que los ratones de 20 meses debido a que en estos últimos la actividad Ts era mayor. De acuerdo con estos trabajos decidimos utilizar ratones Balb/c de 2-3 meses de edad para la producción del suero hiperinmune. Se inoculó una concentración de 2×10^8 UFC/ml de la cepa 1515/97 inactivada por calor a lo largo de 5 semanas. El título de anticuerpos medido por ELISA fue de 1/400. Como el nivel máximo de anticuerpos frente al polisacárido capsular aparece a los 7-14 días tras la inmunización (Lee y cols 1987) obtuvimos el suero hiperinmune una semana después de la última inoculación del antígeno.

Antes de realizar el estudio experimental en animales, analizamos la respuesta “*in vitro*” de antibióticos y anticuerpos anticapsulares específicos mediante curvas de muerte bacteriana simulando el proceso de opsonofagocitosis. Jansen y cols 2001, compararon esta técnica con la citometría de flujo y la técnica de ELISA, encontrando una correlación altamente significativa para las tres técnicas con los STs 6B y 23F. Romero-Steiner y cols 1997 en estudios de opsonofagocitosis analizaron diversos factores apreciando buenos resultados si se utilizaba complemento de cobayo como fuente de complemento y PMNs como células efectoras. Nosotros seguimos esta metodología. En la fagocitosis de neumococo por PMNs, se han descrito dos factores críticos: la concentración de suero y la proporción existente entre el número de PMNs y la concentración de bacteria. Parece que existe una relación directamente proporcional entre concentración de suero hiperinmune y actividad bactericida (Esposito y cols 1990) aunque también se ha sugerido lo contrario, es decir, que la utilización de altas concentraciones de inmunoglobulinas podría saturar los receptores Fc del sistema retículoendotelial, que juegan un papel muy importante en la eliminación de la bacteria opsonizada (Chudwin 1989). En estudios previos realizados en nuestro laboratorio, analizamos diferentes concentraciones de suero y

obtuvimos resultados similares con concentraciones de suero entre el 5% y 40%. Respecto a la relación PMNs / neumococo, Esposito y cols 1990 concluyeron que para que ocurriese la fagocitosis era necesario como mínimo la presencia entre 10 y 1000 PMNs por neumococo. En nuestros experimentos de opsonofagocitosis utilizamos suero al 5% y 10 PMNs por neumococo.

Una de las ventajas que tiene estudiar la opsonofagocitosis mediante curvas de muerte bacteriana es la utilización de bacterias vivas que permiten analizar el efecto de los antibióticos en el suero (Jansen y cols 2001). En esta tesis, observamos que la asociación entre antibióticos β -lactámicos y factores inmunológicos (suero, complemento y PMNs) fue más bactericida que el antibiótico o el sistema inmunológico de forma independiente (figura 5 pag 58). Además, apreciamos que la combinación de los factores inmunitarios con la amoxicilina permitió una reducción mayor del inóculo inicial (3 Log) que la obtenida con la cefotaxima (1 Log). Resultados similares fueron encontrados por Miller y cols 1990, en un estudio mediante curvas de letalidad “*in vitro*” de *Streptococcus* grupo B utilizando una inmunoglobulina comercial intravenosa (IGIV), penicilina, y la combinación de ambas. La IGIV por sí sola, no redujo el inóculo inicial pero cuando se asoció con la penicilina se obtuvo un efecto mayor que la suma de los efectos obtenidos de modo independiente. En este trabajo, a las 4 horas de seguimiento, la reducción en el inóculo inicial con la combinación IGIV + penicilina fue de 3 Log, frente a los 2 Log de reducción que se obtuvieron exclusivamente con la penicilina.

Otros autores han estudiado mediante curvas de muerte bacteriana, el efecto del ácido clavulánico y/o PMNs en la actividad bactericida de amoxicilina frente a una cepa de *S. pneumoniae* ST 9, cuya susceptibilidad era similar a la cepa de nuestro estudio (Martín M y cols 1997). Observaron que la combinación de amoxicilina (a una concentración 2 veces por encima de la CMI) junto a los factores inmunológicos reducía notablemente el crecimiento aunque no el inóculo inicial. Cuando se añadía ácido clavulánico (amoxicilina + ácido clavulánico + suero + PMNs) se observaba una clara reducción del inóculo inicial en torno al 78,4%. La explicación podría ser debida a la unión específica del clavulánico a la PBP3 causando alteraciones en la pared celular y lisis prematura de la bacteria. Esta observación fue descrita por Severin y cols 1997. En nuestro estudio, al combinar por separado amoxicilina y cefotaxima (1CMI) con los factores inmunológicos (suero, complemento y PMNs), obtuvimos unos porcentajes de reducción del inóculo inicial superiores a los obtenidos por los autores indicados. Esta diferencia posiblemente pueda explicarse en función de la concentración de anticuerpos anticapsulares antineumocócicos, ya que un suero con un título bajo, podría ser la causa de una menor actividad fagocítica mediada por PMNs.

En los últimos años está aumentando el interés por los estudios de opsonofagocitosis debido a su capacidad de medir anticuerpos funcionales y porque permiten examinar la capacidad protectora de sueros obtenidos tras inmunización con las vacunas antineumocócicas comercializadas (23-valente y heptavalente). Además, se ha observado que la funcionalidad y capacidad de los anticuerpos para promover fagocitosis permite predecir eficacia en modelos murinos de infección neumocócica. (Alonso de Velasco y cols, 1995). Johnson y cols 1999, encontraron una alta correlación entre opsonofagocitosis y protección mediante inmunización pasiva frente a la bacteriemia murina producida por diferentes cepas de *S. pneumoniae* pertenecientes a distintos serotipos incluido el 6B. Sin embargo en este trabajo no encontraron correlación alguna entre la concentración de anticuerpos medida por ELISA y protección. Saeland y cols 2000, en un estudio en ratones Balb/c encontraron una alta correlación entre actividad opsonica in vitro y protección del suero en un modelo murino de neumonía y bacteriemia. En nuestros estudios de opsonofagocitosis, observamos que la combinación del suero hiperinmune con la amoxicilina mostraba mayor capacidad protectora que la asociación con cefotaxima. Estos resultados se confirmaron cuando realizamos los estudios de terapia combinada en el modelo murino de sepsis neumocócica “*in vivo*”.

El principal objetivo de nuestro trabajo era determinar la interacción entre antibióticos β -lactámicos y el sistema inmunológico en el modelo experimental de sepsis. Previamente debíamos conocer la protección por separado del suero hiperinmune de ratón y de los antibióticos β -lactámicos del estudio. El primer paso fue conocer la dilución de suero que protegía al 100% de los animales frente a una dosis letal de neumococo. En estos experimentos observamos una gran variabilidad de resultados aunque globalmente observamos que la protección por el suero hiperinmune, se correlacionaba con la concentración de anticuerpos ya que con suero puro sobrevivió el 60% de los animales, con suero 1/16 el 40% y con suero diluido ≥ 32 veces no sobrevivió ningún animal (Tabla 5 pag 60). La variabilidad encontrada en los experimentos de seroprotección podría explicarse porque los anticuerpos no son los efectores directos para la eliminación bacteriana sino que esta aclaración depende del complejo de ataque a la membrana y de la fagocitosis en presencia de anticuerpos (Hostetter 2000). Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Stack y cols 1998 en un estudio en el que la administración de dosis crecientes de una inmunoglobulina anti-polisacárido bacteriano redujo la bacteriemia, meningitis y mortalidad en ratas inoculadas con diferentes serotipos de neumococo. También utilizando un modelo de bacteriemia neumocócica en ratones, Johnson y cols 1999, concluyeron que la concentración de inmunoglobulinas necesaria para proteger a los animales, es serotipo dependiente, aunque no encontraron correlación significativa entre la concentración de inmunoglobulina alcanzada en suero y la protección frente a bacteriemia. Nuestro estudio se realizó en

ratones adultos mientras que el estudio de Johnson y cols se hizo, en ratones crías de 13-15 días de edad. Lee y cols 1989 estudiando la respuesta inmune de ratones neonatos observaron que su sistema inmune difería del de adultos en su inmadurez funcional (Lee y cols 1989) por lo que este factor podría explicar la falta de correlación.

Recientemente, Saeland y cols 2000, analizaron la capacidad protectora de anticuerpos frente a la neumonía neumocócica y bacteriemia producida por diferentes serotipos. La inmunización pasiva con una preparación de IgG humana por vía IP, eliminó los neumococos del pulmón de los animales infectados, protegiendo a los ratones en forma dosis dependiente. Este experimento sugiere que la inmunización pasiva no sólo es útil para el tratamiento de septicemias, sino también, para neumonías producidas por *S. pneumoniae* que es el principal agente etiológico de neumonías adquiridas en la comunidad (McCullers y Tuomanen 2001, Fedson y cols 1999). El estudio apoya la sugerencia de Robbins y cols 1995, acerca de la importancia de la IgG en la protección frente a neumococo vía inducción de respuesta inflamatoria en los pulmones estimulando la migración de los PMNs al pulmón favoreciendo así la fagocitosis.

Uno de los objetivos planteados en nuestro estudio era analizar si la administración de inmunoterapia específica podría alterar determinados parámetros como la reducción de la mortalidad, el retraso en la muerte de los animales y su relación con el perfil bacteriémico en sangre (que define la capacidad para invadir al hospedador). Además, estudiamos la modificación del perfil bacteriémico producido por diferentes concentraciones bacterianas partiendo del concepto de virulencia como la mínima masa bacteriana capaz de producir daño a un hospedador (Lorian y Gemmell, 1991) o bien como competencia de un agente infeccioso para producir efectos patológicos (Gemmell y Lorian, 1996).

La administración de suero hiperinmune (no diluido o diluido al 1/4) produjo tres efectos significativos:

- I. disminución de la mortalidad
 - II. retraso significativo en la muerte
 - III. modificación del perfil bacteriémico
- I) La disminución a corto plazo en la mortalidad ha sido demostrada por otros autores (Chudwin 1989, Aaberge 1996, Saeland 2000-2001, de Hennezel 2001) mediante la administración de inmunoglobulinas humanas por vía parenteral o intranasal, en modelos de neumonía y sepsis neumocócica. En nuestro trabajo, la administración intraperitoneal de suero hiperinmune disminuyó la

mortalidad y este efecto fue concentración dependiente. En las primeras 72h de seguimiento la supervivencia fue del 100% y del 80% con el suero no diluido y diluido al 1/4 respectivamente, por el contrario, la mortalidad fue del 80% con el suero diluido al 1/16 y 100% en el grupo control (Tabla 20 pag 80). El efecto del suero no inmune como placebo no fue diferente del obtenido con PBS como placebo. Estos resultados contrastan con los obtenidos por otros autores en estudios previos, en los cuales, la administración de suero humano normal (sin anticuerpos anticapsulares o anticuerpos anti PsC) tuvo algún efecto protector en ratones (Musher y cols 1990). Debido a que los ratones son deficientes en complemento el efecto protector podría deberse a la presencia de complemento humano en ese estudio (Musher y cols 1990).

II) Con respecto al retraso en la muerte de los animales, utilizamos un período de seguimiento de 15 días para poder discriminar claramente entre reducción en la mortalidad y retraso en la mortalidad. En nuestro estudio, encontramos un retraso significativo en la mortalidad en las primeras 144 horas de seguimiento con el suero no diluido, diluido al 1/4 y diluido al 1/16 cuando se comparan con el grupo control. Este retardo en la mortalidad fue dilución dependiente (Tabla 20 pag 80).

III) La detección de bacteria en sangre se realizó a partir de muestras obtenidas de la vena de la cola con seguimiento individualizado de los animales. Una metodología similar ha sido descrita por otros autores (Saladino y cols, 1997; Johnson y cols 1999; Saeland y cols 2000). De esta manera se evitan posibles variaciones entre animales y además se reduce el número de ratones. Salo y cols 1999, han estudiado la bacteriemia en ratones producida por una cepa de ST 3 mediante detección de neumococo por PCR comparándola con el cultivo, encontrando una mayor sensibilidad de la PCR. El inconveniente de esta técnica radica en el excesivo volumen de sangre que requiere (1 ml) por lo que su aplicación a nuestros estudios de perfil bacteriémico sería poco viable.

En relación con la modificación del perfil bacteriémico en presencia de anticuerpos específicos (Figuras 15 y 16 pag 81 y 82), en nuestro estudio observamos que:

1. Existe una disminución de la curva bacteriémica cuando se administra suero puro o diluido 1/4, independientemente de si los animales sobreviven o no (bacteriemia mantenida $\geq 10^8$ UFC/ml en el grupo control, entre 10^{6-8} UFC/ml en animales tratados con suero pero que murieron y $\leq 10^6$ UFC/ml en animales tratados con suero y que sobrevivieron).

2. Existe una relación entre bacteriemia y mortalidad: bacteriemia con recuentos de colonias mantenidos $\geq 10^6$ UFC/ml y/o con recuentos $\geq 10^6$ UFC/ml desde 24-48h se relacionaron con muerte.

En conclusión, en el estudio, la protección con suero hiperinmune específico produjo una variación en los perfiles bacteriémicos que implicaron reducción de la mortalidad a lo largo del tiempo mediante una disminución cuantitativa de la concentración bacteriana en sangre de la cepa de *S. pneumoniae* ST 6B. Esta observación podría ser útil para combatir el fenómeno de la resistencia bacteriana ya que cepas resistentes de neumococo, en presencia de anticuerpos específicos serán más fáciles de tratar con dosis menores de antibióticos, reduciéndose de este modo, el riesgo de selección de variantes resistentes. (Crook y Spratt, 1998 y Jacobs, 1999).

Otro de los objetivos planteados en nuestro estudio era analizar la protección mediada por el tratamiento con los dos antibióticos, la modificación del perfil bacteriémico y la relación entre esta modificación y las tasas de mortalidad. Dos de los parámetros habitualmente utilizados para evaluar eficacia antibiótica en modelos animales, son las tasas de supervivencia y los recuentos bacterianos en líquidos tisulares (Frimodt Moller y cols, 1999). El primero es fácil de determinar y parece tener mayor relevancia desde la perspectiva clínica ya que permite conocer diferencias en el comportamiento de los antibióticos (Frimodt Moller y cols, 1993). La reducción en los recuentos bacterianos proporciona información sobre la actividad bactericida “*in vivo*” (Frimodt Moller, 1999), sin embargo, nunca se ha establecido la relación entre el inóculo “*in vitro*” y la reducción del inóculo “*in vivo*” (Amsterdam, 1990), ni tampoco se ha podido relacionar hasta el momento la reducción en el recuento bacteriano con la supervivencia de los animales (Frimodt Moller, 1993).

En la presente tesis, se utilizó como cepa del estudio un neumococo de ST 6B con susceptibilidad disminuida a AMX y CTX y cuyos valores de CMI son representativos de la CMI en los aislados de ST 6 en España (Marco y cols 2000). Esta cepa produjo un 100% de mortalidad en los animales no tratados con antibióticos. La disminución en la mortalidad fue del 100% y 80% cuando los ratones se pautaron con dosis de AMX 25 mg/Kg y CTX 50 mg/Kg respectivamente (Tabla 6 y 7 pag 61 y 62). La C_{max} y el AUC fueron, respectivamente, 270,6 mg/L y 7657,7 mg/min/L para AMX 25 mg/Kg y 621,4 mg/L y 16483,8 mg/min/L para CTX 50 mg/Kg (Tabla 12. pag 67). Estas dosis de antibiótico, permitieron alcanzar un $\Delta T > CMI$ de aproximadamente el 30% del intervalo de dosificación, un valor cercano al descrito para eficacia de β -lactámicos por otros autores en diferentes modelos animales de infección tales como, ratas, ratones y conejos. (Dalhoff y Ullman, 1990 y Craig,

1998). En estos estudios ya se indicaba que la concentración de antibiótico no necesita exceder la CMI durante el 100% del intervalo de dosificación para ejercer un efecto antibacteriano significativo. Craig en 1998 demostró que un tiempo sobre la CMI ($\Delta T > CMI$) en torno a un 40-50% del intervalo de dosis, se correlaciona con supervivencia y por tanto con eficacia terapéutica, encontrando también que los porcentajes son más bajos para penicilinas que para cefalosporinas, reflejando la mayor rapidez en la muerte bacteriana cuando se utiliza penicilina. Los datos obtenidos en nuestro estudio están en concordancia con esta observación ya que el 100% de supervivencia se obtuvo con un $\Delta T > CMI$ del 26% para la dosis de AMX 25 mg/Kg pero no con un $\Delta T > CMI$ del 32% para CTX 50 mg/Kg.

Además se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P = 0.014$) para ambos antibióticos en las curvas de supervivencia. La dosis eficaz (DE_{50}) en el modelo teórico fue 12,6 mg/Kg para AMX y 47,5 mg/Kg para CTX. La eficacia media relativa entre los antibióticos fue 0,2657 a favor de la amoxicilina. En nuestros estudios "*in vitro*" la AMX mostró diez veces mayor actividad bactericida que la CTX y la protección obtenida en el modelo de sepsis murina también fue mayor (100% de protección con las dosis de AMX 100, 50 y 25 mg/Kg, y 100%, 80% y 35% de protección con las mismas dosis de CTX). Estos resultados sugieren la existencia de una correlación entre los estudios "*in vitro*" y la protección observada "*in vivo*". Un efecto similar fue observado por Pérez-Trallero y cols 1998, al estudiar la actividad "*in vitro*", "*in vivo*" y "*ex vivo*" de AMX y cefalosporinas de 2ª y 3ª generación, encontrando que la AMX exhibió la máxima actividad bactericida "*in vitro*", siendo además el único de los antibióticos con el que se consiguió un 100% de supervivencia en el estudio murino. La concordancia entre los estudios "*in vivo*" e "*in vitro*" también fue señalada por Knudsen y cols 1995 y 1997, en cepas con diferentes susceptibilidades a penicilina encontrando un significativo paralelismo entre la CMI y la DE_{50} .

En contraste con estudios previos, donde los recuentos de los neumococos en sangre no se correlacionaron con supervivencia en los animales tratados con penicilina (Frimodt Moller y Thomsen, 1986), en nuestro estudio, utilizando una cepa resistente a penicilina, los recuentos bacterianos fueron buenos indicadores de la supervivencia o muerte de los animales. Los dos antibióticos β -lactámicos (amoxicilina en mayor grado), disminuyeron las tasas de letalidad de una cepa de neumococo serotipo 6B mediante reducción del recuento de colonias del perfil bacteriémico (Fig 17 y 18 pag 85 y 86). En los animales que recibieron antibioterapia y sobrevivieron, los recuentos bacterianos fueron $< 10^6$ UFC/ml durante las 360 horas de seguimiento. Por el contrario, un recuento $> 10^6$ UFC/ml mantenido durante las primeras 144 h estuvo asociado a la muerte de los animales. Cuando realizamos el estudio estadístico, encontramos una relación estadísticamente significativa

entre la máxima UFC/ml en sangre y la mortalidad, con $\beta_0 = -15,21$ y $\beta_1 = 2,5944$ como coeficientes de regresión logística. Además, un máximo de 6,5 log UFC/ml se asoció con un 84% de probabilidad de muerte. Otro parámetro que analizamos fue el retraso en la muerte de los animales, encontrando que los porcentajes de supervivencia a las 360 h fueron idénticos a los obtenidos a las 144 h. El tiempo medio de supervivencia para la AMX fue mayor que el obtenido con la CTX en cada dosis (media de días para AMX frente a CTX: 2,1 frente al 1,7 para la dosis de 6,25 mg/Kg, 8,7 días frente a 2,9 para la dosis de 12,5 mg/Kg, >15 días frente a 2,9 para la dosis de 25 mg/Kg y > 15 días frente a 11 para la dosis de 50 mg/Kg) (Tabla 21 pag 84).

Los antibióticos β -lactámicos tienen poco o ningún efecto en la quimiotaxis, en la actividad fagocítica de los leucocitos (muerte y respuesta metabólica), o en la actividad intracelular (muy baja penetración intracelular) frente a la bacteria fagocitada, pero actúan positivamente mediante interacción indirecta con la bacteria para su fagocitosis (Milatovic 1983). Varios estudios han sugerido un efecto combinado “*in vitro*” y “*ex vivo*” de los β -lactámicos y el sistema inmunológico vía complemento y opsonofagocitosis (Gómez-Lus y cols 1997, Martín y cols 1997, Gómez-Lus y cols 1998), debido a que ambas armas (β -lactámicos y sistema inmune) actúan sobre la pared celular. La alteración de la estructura de la pared celular por los β -lactámicos, seguido de opsonización y fagocitosis, supera los impedimentos capsulares para el reconocimiento de C3b en la superficie bacteriana por los leucocitos polimorfonucleares (PMNs) (Severin y cols 1997).

En general, se han realizado pocos estudios para determinar la influencia del estado inmunológico en la eficacia del tratamiento con los antibióticos. A finales de la década de los 40 con el desarrollo de las sulfamidas y el comienzo de la era antibiótica, se utilizaron terapias basadas en anticuerpos y antibióticos conjuntamente. La utilización de sulfamidas junto a sueros inmunes de caballo, conejo y humanos mostraron resultados prometedores frente a diferentes patógenos como *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus* Grupo A y B etc (Casadevall y Scharff 1995). Más adelante, Dalhoff 1984, en un modelo experimental en ratas, demostró la existencia de un sinergismo entre acilureidopenicilinas e inmunoglobulina G frente a bacterias gram-positivas y gram-negativas productoras de β -lactamasa como *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Sin embargo no observó sinergismo cuando las cepas no eran productoras de β -lactamasa. Este autor sugirió que los efectos beneficiosos de la administración conjunta de inmunoseroglobulina y mezlocilina podrían ser debidos a una interacción de la inmunoseroglobulina con la actividad hidrolítica de las β -lactamasas.

En el año 1989, Chudwin analizó la actividad protectora de tres preparaciones comerciales de inmunoglobulinas intravenosas (IGIV) desde el punto de vista profiláctico, terapéutico o combinado con penicilina G. En este trabajo los animales fueron inoculados con dosis letales de neumococo ST 3 y ST 7F (antes o después de la IGIV). Cuando analizaron la asociación terapéutica de la IGIV y penicilina G, encontraron mayor protección en la combinación IGIV y penicilina G que la obtenida por separado aunque nunca fue superior a la suma de los efectos de modo independiente. Recientemente ha sido descrito un caso de combinación terapéutica efectiva con dosis subcurativas de ampicilina e inmunoglobulinas intravenosas en un modelo experimental murino. En este trabajo, De Hennezel y cols 2001 desarrollaron un modelo de neumonía neumocócica por una cepa de neumococo ST 3 susceptible a ampicilina. Demostraron mayor supervivencia (90%) en el grupo de animales inoculados con la terapia combinada, frente al 20% y 30% de protección en los grupos tratados con dosis subcurativas de ampicilina e IVIG, respectivamente.

Para estudiar la colaboración de la inmunidad específica y los antibióticos β -lactámicos en un modelo murino de sepsis neumocócica deberían considerarse los siguientes parámetros:

- 1) Tasas de supervivencia para estudiar el efecto en los animales infectados.
- 2) Efecto sobre el perfil bacteriémico para estudiar la acción directa sobre la bacteria infectiva.

Si existiese un efecto combinado entre antibióticos y anticuerpos específicos, debería aumentar la destrucción de la bacteria y por tanto producirse un incremento en las tasas de supervivencia. Aunque los estudios publicados sobre este tema han utilizado cepas de neumococo sensibles a penicilina (Chudwin 1989, de Hennezel 2001), el concepto se vería reforzado si los estudios se diseñaran en condiciones experimentales más exigentes como por ejemplo, utilizando cepas de *S. pneumoniae* resistentes a penicilina y pertenecientes a serotipos de alta prevalencia. Además, los resultados ideales serían aquellos que utilizando un modelo experimental, la acción combinada consiguiera un 100% de supervivencia (frente al 0% en el grupo control), una reducción notable en los recuentos de colonias en sangre y que la esterilidad de la sangre (desaparición de la bacteriemia), ocurriera lo antes posible. En este sentido, la presente tesis muestra los resultados obtenidos utilizando una cepa de neumococo ST 6B multiresistente con un patrón de tipo PCTEX (penicilina, cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina y cefotaxima) que es representativo de los patrones de resistencia en España (Fenoll y cols 1998, Marco y cols 2000), poco inmunogénica (Heinzel 2000) y muy prevalente tanto en la nasofaringe de portadores (Ghaffar y cols 1999) como en infecciones del tracto respiratorio en nuestro país (Perez-Trallero y cols 2001).

Cuando se utilizó la combinación de terapia antibiótica con inmunoprotección, la dosis protectora disminuyó ocho veces hasta amoxicilina 3,12 mg/Kg y cefotaxima 6,25 mg/Kg (Tabla 13 pag 68). En términos de inmunoprotección, dosis sub-terapéuticas de antibióticos incrementaron las tasas de supervivencia obtenidas con el suero hiperinmune, desde el 60-40% hasta el 100% (con diluciones 1/2 y 1/4 respectivamente). Desde la perspectiva antibiótica, la presencia de anticuerpos específicos permitió obtener eficacia terapéutica con concentraciones sub-inhedorias de los antibióticos.

La desaparición de la bacteriemia (recuentos de colonias por debajo del límite de detección) se obtuvo en un período de tiempo más corto en el grupo de los animales seroprotectidos y tratados con amoxicilina (día 17) que en los animales seroprotectidos pero no tratados con el antibiótico (día 20) (fig 19 pag 89). Este hecho sugiere que la adición de amoxicilina en concentraciones sub-inhedorias en el suero de ratón, aceleró la muerte bacteriana y por consiguiente dio lugar a una reducción de la mortalidad. El efecto terapéutico de antibióticos y suero hiperinmune en los animales pre-inmunitizados podría ser atribuido a un incremento en la tasa de eliminación de los microorganismos después del tratamiento antibiótico.

El efecto sinérgico de un agente β -lactámico y el sistema inmune produciendo una muerte bactericida más rápida, ha sido demostrado *in vitro* con la inmunidad no específica (Gómez-Lus y cols 1997 y Gómez-Lus y cols 1997). En nuestro estudio, la inmunidad no específica no fue decisiva, ya que el complemento y los PMNs estuvieron presentes en los animales no inmunitizados que recibieron dosis sub-terapéuticas de amoxicilina, muriendo el 100% de los animales. Por lo tanto, los resultados obtenidos en el grupo combinado deberán atribuirse a la colaboración de dosis sub-terapéuticas con la inmunidad pasiva específica, abriendo la posibilidad de una nueva vía en el tratamiento de infecciones causadas por neumococos resistentes a penicilina. Desde el punto de vista farmacodinámico, estos resultados son de interés ya que en presencia de anticuerpos, se obtuvo un 100% de eficacia, disminuyendo el $\Delta T/CMI$ necesario para eficacia desde el 25,6% del intervalo de dosis hasta el 2,8% con amoxicilina y desde el 32,5% del intervalo de dosis al 5,4% con cefotaxima, en presencia de anticuerpos específicos (inducidos por inmunización pasiva).

Cuando se combinó de forma conjunta la antibioterapia con la seroterapia (administración del suero y del antibiótico post-infección) (tabla 19 pag 76), se consiguió un retraso en la mortalidad con diferencias ($p < 0,01$; test log rank) estadísticamente significativas al comparar con los otros grupos del

estudio y además permitió una tasa media de supervivencia de más de 336 horas frente a las 36 horas que se obtuvieron en los otros grupos. También cuando se comparan los resultados obtenidos en este modelo con los que se obtuvieron cuando el suero hiperinmune se administraba 1 hora antes de la bacteria, observamos que la supervivencia fue mayor si la administración del suero hiperinmune se hacía previamente a la infección que si se hacía post-infección. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por de Hennezel y cols 2001 en un estudio murino en el que la administración de IGIV 24h antes de la infección fue hasta 100 veces más efectiva que cuando se administró después de la infección.

Teniendo en cuenta el patrón de resistencia de la cepa de nuestro estudio, estos resultados sugieren que las estrategias de inmunización en humanos mediante la utilización de vacunas frente a los serotipos neumocócicos incluidos en el grupo de resistencia (Marco y cols 2000) podrían ser más efectivas para lograr eficacia antibiótica que la administración simultánea de seroterapia (como en la era preantibiótica) y antibacterianos que actúan sobre la pared celular bacteriana. De hecho, Powell y cols 1988 demostraron en un modelo experimental de sepsis neumocócica por un ST 3 en ratas esplenectomizadas que la administración profiláctica de la vacuna 23 valente (1 mes antes) y penicilina (1 día después) protegía a todos los animales mientras que únicamente con la vacuna sobrevivía el 20%. Los resultados obtenidos en la presente tesis, ofrecen nuevas perspectivas para el diseño de novedosas estrategias terapéuticas o profilácticas. Por ejemplo, la inclusión de serotipos en futuras vacunas debería tener en cuenta la susceptibilidad a los antibióticos en presencia de factores inmunológicos. De todos modos, es necesario realizar nuevos estudios con otros serotipos y con cepas de diferentes susceptibilidades para demostrar que este efecto farmacodinámico es extensible a toda la población de *S. pneumoniae*. El desarrollo de inmunoprotección y / o inmunoterapia para solucionar el problema de la resistencia, puede proporcionar nuevas estrategias de supervivencia (Keller y Stiehm 2000). La presencia de anticuerpos específicos favorece la fagocitosis por PMNs de modo que es preferible la muerte intracelular del neumococo al efecto bactericida de los antibióticos y como resultado al aumento de los niveles de toxinas y componentes bacterianos que podrían dañar al hospedador. Si como hemos demostrado en la presente tesis la presencia de anticuerpos permite que se necesite menor dosis de antibiótico para obtener una protección total, se reduciría además la toxicidad por los antibióticos.

VI. CONCLUSIONES

De los estudios realizados a lo largo de esta Memoria, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Los aislados clínicos pertenecientes a los STs 9v, 14, 19 y 23 con susceptibilidad disminuida a la penicilina son avirulentos en ratones. Solamente el 13% de las cepas del ST 6B fueron virulentas en los ratones.
2. La protección de los ratones por el suero hiperinmune diluido al 1/4 fue del 60% encontrando cierta variabilidad que hace necesaria la realización de varios experimentos de seroprotección para obtener un valor representativo.
3. La protección de los ratones con los antibióticos AMX 25mg/Kg y CTX 50mg/kg fue del 100% y 80% respectivamente. Estas dosis permitieron alcanzar un $\Delta T > CMI$ de aproximadamente el 30% del intervalo de dosificación, un valor cercano al descrito para eficacia por otros autores en diferentes modelos animales de infección.
4. La protección por la terapia combinada fue del 100% con el suero diluido al 1/4 y una dosis de amoxicilina y cefotaxima de 3,12 mg/Kg y 6,25 mg/Kg respectivamente, reduciéndose ocho veces la dosis eficaz para cada antibiótico.
5. La disminución de las tasas de letalidad fue consecuencia de la reducción del recuento de colonias del perfil bacteriémico. Estos recuentos fueron buenos indicadores de la supervivencia o muerte de los animales.
6. Desde el punto de vista farmacodinámico, en presencia de anticuerpos se obtuvo un 100% de eficacia, disminuyendo el $\Delta T > CMI$ necesario para eficacia desde el 26-32% con los antibióticos hasta el 3-6% en presencia de anticuerpos específicos.
7. Existe una correlación entre la actividad bactericida "*in vitro*" y los estudios de protección "*in vivo*". La AMX mostró mayor actividad que la CTX en presencia o ausencia de suero hiperinmune.
8. La administración conjunta de antibióticos y suero hiperinmune retrasó la muerte y aumentó las tasas de supervivencia en relación a los antibióticos y el suero de forma independiente. Sin

embargo la protección fue inferior a la obtenida con la administración del suero una hora antes de la bacteria.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aaberge, I.S., B. Hvalbye, and M. Lovik.** 1996. Enhancement of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B infection in mice after passive immunization with human serum. *Microb Pathog.* **21**: 125-137.
- Aaberge, I.S., M. Lovik.** 1996. The antibody response after immunization with pneumococcal polysaccharide vaccine in splenectomized mice: the effect of re-immunization with pneumococcal antigens. *APMIS.* **104**: 307-317.
- Alexander, J. E., R. A. Lock, C. C. A. M. Peeters, J. T. Poolman, P. W. Andrew, T. J. Mitchell, et al.** 1994. Immunization of mice with pneumolysin toxoid confers a significant degree of protection against at least nine serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* **62**: 5683-5688.
- Alonso de Velasco, E., A.F.Verheul, J. Verhoef, and H. Snippe.** 1995. Streptococcus pneumoniae: virulence factors, pathogenesis and vaccines. *Microbiol. Rev.* **59**: 591-603.
- Alonso de Velasco, E., B. A. T. Dekker, A. F. M. Verheul, R. G. Feldman, J. Verhoef, and H. Snippe.** 1995. Anti-polysaccharide immunoglobulin isotype levels and opsonic activity of antisera: relationships with protection against *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Journal Infect Dis.* **172**: 562-5.
- Amsterdam, D.** 1990. Assessing cidal activity of antimicrobial agents: problems and pitfalls. *The Antimicrobial Newsletter.* **7**: 49-56.
- Anderson, B., J. Dahmen, T. Frejd, H. Leffler, G. Magnusson, G. Noori, and C. Svadborg-Edén.** 1983. Identification of an active disaccharide unit of a glycoconjugate receptor for Pneumococci attaching to human pharyngeal epithelial cells. *J. Exp. Med.* **158**: 559-570.
- Appelbaum, P.C.** 1992. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an overview. *Clin. Infect. Dis.* **15**:77-83.
- Appelbaum, P.C.** 2000. Microbiological and pharmacodynamic considerations in the treatment of infection due to antimicrobial-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis.* **31**: S29-S34.
- Armstrong D.** 1993. History of opportunistic infection in the immunocompromised host. *Clin Infect Dis.* **17 (suppl 2)**: S318-21.
- Austrian, R.** 1986. Some aspects of the pneumococcal carrier state. *J. Antimicrob. Chemother.* **18 (Suppl, A)**, 35-45.
- Austrian, R., and J. Gold.** 1964. Pneumococcal bacteremia with special reference to bacteremic pneumococcal pneumonia. *Ann. Intern. Med.* **60**: 759-776.
- Avanzini, M.A., A.M. Carra, R. Maccario, M. Zecca, P. Pignatti, M. Marconi, et al.** 1995. Antibody response to pneumococcal vaccine in children receiving bone marrow transplantation. *J. Clin. Immunol.* **15**: 137-144.
- Avery, O.T., and W.F. Goebel.** 1933. Chemo-immunological studies of the soluble specific substance of pneumococcus. I. The isolation and properties of the acetyl polysaccharide of pneumococcus type I. *J. Exp. Med.* **58**: 731-755.

- Azoulay-Dupuis, E., V. Rieux, M. Muffat-Joly, J.P. Bédos, E. Vallée, C. Rivier, et al.** 2000. Relationship between capsular type, penicillin susceptibility, and virulence of human *Streptococcus pneumoniae* isolates in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**: 1575-1577.
- Baker, P.J.** 1992. T cell regulation of the antibody response to bacterial polysaccharide antigens: an examination of some general characteristics and their implications. *Journal Infect Dis.* **165 (suppl 1)**: S44-48.
- Balcabao, I.P., L. Aguilar, M. Martín, Y. García, R. Dal-Ré, and J. Prieto.** 1996. Activities against *Streptococcus pneumoniae* of amoxicillin and cefotaxime at physiological concentrations: In vitro pharmacodynamic simulation. *Antimicrob Agents Chemother.* **40**: 2904-2906.
- Barnard, J.P., and M.W. Stinson.** 1996. The alpha-hemolysin of *Streptococcus pneumoniae* is lipoteichoic acid. Improved preparation, chemical and mass spectrometric studies. *Eur. J. Biochem.* **207**: 1063-1075.
- Benton, K.A., M.P. Everson, and D.E. Briles.** 1995. A pneumolysin-negative mutant of *Streptococcus pneumoniae* causes chronic bacteremia rather than acute sepsis in mice. *Infect. Immun.* **63**: 448-455.
- Borghesi, C., and C. Nicoletti.** 1995. In vivo and in vitro study of the primary and secondary antibody response to a bacterial antigen in aged mice. *Int J Exp Path.* **76**: 419-424.
- Boulnois, G.J.** 1992. Pneumococcal proteins and pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 249-259.
- Braconier, J.H., F.K. Pedersen, H. Odeberg, and C. Rosen.** 1984. Opsonic and antibody responses to pneumococcal polysaccharide types 6A, 19F and 23F after vaccination of immunocompromised patients. *Scand. J. Infect. Dis.* **16**:161-167.
- Breiman, R.F., Butler, F.C. Tenover, J.A. Elliott, and R.R. Faklam.** 1994. Emergence of drug-resistant pneumococcal infections in the United States. *JAMA* **271**: 1831-1835.
- Briles, D.E., E. Ades, J.C. Paton, J.S. Sampson, G.M. Carlone, R.C. Huebner, A. et al.** 2000. Intranasal immunization of mice with a mixture of the pneumococcal proteins PsaA and PspA is highly protective against nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **68**: 796-800.
- Briles, D.E., M.J. Crain, B.M. Gray., D. Forman and J. Yother.** 1992. Strong association between capsular type and virulence for mice among human isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* **60**: 111-116.
- Brown, E.J., K.A. Joiner, R.M. Cole, and M. Berger.** 1983. Localization of complement component 3 on *Streptococcus pneumoniae*: anti-capsular antibody causes complement deposition on the pneumococcal capsule. *Infect. Immun.* **39**: 403-409.
- Bruyn, G.A., B.J. Zegers, and R. van Furth.** 1992. Mechanisms of host defence against infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Clin. Infect. Dis.* **14**: 251-262.
- Brzin, B.** 1969. Reversion of α -into β -hemolysis of *Diplococcus pneumoniae* by low concentration of optochin. *Experientia.* **25**: 985-986.
- Carlsen, B.D., M. Kawana, C. Kawana, A. Tomasz, and G.S. Giebink.** 1992. Role of the bacterial cell wall in middle ear inflammation caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **60**: 2850-2854.
- Casadevall, A.** 1996. Antibody-based therapies for emerging infectious diseases. *Emerg Infect Dis.* **2**: 200-208
- Casadevall, A., Scharff, M.D.** 1994. Serum therapy revisited: animal models of infection and development of passive antibody therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* **38**: 1695-1702.

- Casadevall, A., Scharff, M.D.** 1995. Return to the past: the case for antibody-based therapies in infectious diseases. *Clin Infect Dis.* **21**: 150-161.
- Casal, J.** 1982. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*. Serotype distribution of penicillin-resistant strains in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **22**: 222-225.
- Chavanet, P., F. Dalle, P. Delisle, M. Duong, A. Pechinot, M. Buisson, et al.** 1998. Experimental efficacy of combined ceftriaxone and amoxicillin on penicillin-resistant and broad-spectrum cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection. **41**: 237-246.
- Chester, F.D.** 1901. A manual of determinative bacteriology. The MacMillan Co., New York.
- Chudwin, D. S.** 1989. Prophylaxis and treatment of pneumococcal bacteremia by immune globulin intravenous in a mouse model. *Clin Immunol Immunopath.* **50**: 62-71.
- Claverys, J.P. M. Prudhomme, I. Mortier-Barrire, and B. Martin.** 2000. Adaptation to the environment: *Streptococcus pneumoniae*, a paradigm for recombination-mediated genetic plasticity? *Mol. Microbiol. Jan*; 35 (2): 251-259. **35**: 251-259.
- Craig, W.A.** 1998. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis.* **26**: 1-12.
- Crook, D. W., and B. G. Spratt.** 1998. Multiple antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Br Med Bull.* **54**: 595-610.
- Cundell, D.R. and E.I. Tuomanen.**1994. Receptor specificity of adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human type-II pneumocytes and vascular endothelial cells *in vitro*. *Microb. Pathog.* **17**:361-374.
- Dagan, R., M. Isaachson, R. Lang, J. Karpuch, C. Block and J. Amir.** 1994. Epidemiology of paediatric meningitis caused by *Haemophilus influenzae* type b, *Streptococcus pneumoniae*, and *Neisseria meningitidis* in Israel: a 3-year nationwide prospective study. *J. Infect Dis.* **169**: 912-916.
- Dalhoff, A.** 1984. Synergy between acylureidopenicillins and immunoglobulin G in experimental animals. *Am J Med.* **March 30**: 91-100.
- Dalhoff, A., and U. Ullmann.** 1990. Correlation between pharmacokinetics, pharmacodynamics and efficacy of antibacterial agents in animal models. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **9**: 479-487.
- De Haas, M., M. Kleijer, R. Van Zwieten, D. Roos, and A.E. von dem Borne.** 1995. Neutrophil Fc gamma RIIIb deficiency, nature, and clinical consequences: a study of 21 individuals from 14 families. *Blood.* **86**: 2403-2413.
- De Hennezel, L., F. Ramiise, P. Binder, G. Marchal, and J. M. Alonso.** 2001. Effective combination therapy with ampicilin and intravenous immunoglobulins in a mouse model. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**: 316-318.
- Dowson, C.G., T.J. Coffey, and B.G. Spratt.** 1994. Origin and molecular epidemiology of penicillin-binding-protein-mediated resistance to β -lactam antibiotics. *Trends Microbiol.* **2**: 361-365.
- Eggleton, P., R. Gargan., and Fisher, D.** 1989. Rapid method for the isolation of neutrophils in high yield without the use of dextran or density gradient polymers. *Journal of Immunol Methods.* **121**: 105-113.
- Eskola, J., M. Anttila.** 1999. Pneumococcal conjugate vaccines. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **18**: 543-551.

- Esposito, A. L., C. A. Clark, and W. J. Poirier.** 1990. An assessment of the factors contributing to the killing of type 3 *Streptococcus pneumoniae* by human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *APMIS*. **98**: 111-121.
- Fedson, D. S., J. Anthony, and G. Scott.** 1999. The burden of pneumococcal disease among adults in developed and developing countries: what is and is not known. *Vaccine*. **Suppl 1**. 11-18.
- Fenoll, A., C. Martín-Bourgon, R. Muñoz, D. Vicioso, and J. Casal.** 1991. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates causing systemic infections in Spain, 1979-1989. *Rev. Infect. Dis.* **13**: 56-60.
- Fenoll, A., I. Jado, D. Vicioso, A. Pérez, and J. Casal.** 1998. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antibiotic Resistance in Spain: Update (1990 to 1996). *J. Clin. Microbiol.* **36**: 3447-3454.
- Fenoll, A., I. Jado, D. Vicioso, S. Berrón, J.E. Yuste, and J. Casal.** 2000. *Streptococcus pneumoniae* in Children in Spain: 1990-1999. *Acta Paediatrica Suppl* **435**: 44-50.
- Fenoll, A., R. Muñoz, E. García, y A.G. de la Campa.** 1994. Molecular basis of the optochin sensitive phenotype of pneumococcus: characterization of the genes encoding the F₀ complex of the *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis* H⁺-ATPases. *Mol. Microbiol.* **12**: 587-598.
- Filipe, S.R., and A. Tomasz.** 2000. Inhibition of the expression of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by inactivation of cell wall muropeptide branching genes. *Proc Natl Acad Sci.* **97**: 4891-96.
- Frank, M.M., M. Basta, and L.F. Fries.** 1992. The effects of intravenous immune globulin on complement-dependent immune damage of cells and tissues. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **62**: S82-6.
- Freijd, A., L. Hammarstrom, M.A. Persson, and C.I. Smith.** 1984. Plasma anti-pneumococcal antibody activity of the IgG class and subclasses in otitis prone children. *Clin. Exp. Immunol.* **56**: 233-238.
- Frimodt-Moller, N.** 1993. The mouse peritonitis model: present and future use. *J Antimicrob Chemother.* **31** (suppl): 55-60.
- Frimodt-Moller, N., and V. F. Thomsen.** 1986. The pneumococcus and the mouse protection test: inoculum, dosage and timing. *APMIS*. **94**: 33-37.
- Frimodt-Moller, N., J. D. Knudsen, F. Espersen.** 1999. The mouse peritonitis/sepsis model. In: Zak O, Sande A. eds. *Handbook of animal models of infection*. London: Academic Press, 127-36.
- Gemmell, C.G., and V. Lorian.** 1996. Effects of low concentrations of antibiotics on bacterial ultrastructure, virulence and susceptibility to immunodefenses: clinical significance. In *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4th edn, (Lorian, V, Ed.), pp. 397-452. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
- Ghaffar, F., I. R. Friedland and G. H. McCracken.** 1999. Dynamics of nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Ped Infect Dis J.* **18**: 638-46.
- Gillespie, S.H.** 1989. Aspects of pneumococcal infection including bacterial virulence, host response and vaccination. *J. Med. Microbiol.* **28**: 237-248.
- Gillespie, S.H., M.D. Smith, A. Dickens, J.G. Raynes, and K.P. McAdam.** 1995. Detection of C polysaccharide in serum of patients with *Streptococcus pneumoniae* bacteraemia. *J. Clin. Pathol.* **48**: 803-806.
- Goffin, C., J.M. Ghuysen.** 1998. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 1079-1093.

- Gómez-Lus, M. L., L. Aguilar, M. Martín, M. J. Giménez, P. Martínez, and J. Prieto.** 1997. Intracellular and extracellular killing of a penicillin-resistant, serotype 9 strain of *Streptococcus pneumoniae* by polymorphonuclear leucocytes in the presence of sub-inhibitory concentrations of clavulanic acid. *J Antimicrob Chemother.* **40:** 142-4.
- Gómez-Lus, M. I., M. J. Giménez, J. Prieto, M. Martín J. Frias, and L. Aguilar.** 1998. Effect of polymorphonuclear neutrophils on serum bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae* after amoxicillin administration. *Eur J Clin Microb Infect Dis.* **17:** 40-43.
- Gordon, D.L., G.M. Johnson, and M.K. Hostetter.** 1986. Ligand-receptor interactions in the phagocytosis of virulent *Streptococcus pneumoniae* by polymorphonuclear leucocytes. *J. Infect. Dis.* **154:** 619-626.
- Gosink, K.K., R. Mann, C. Guglielmo, E.I. Tuomanen and H.R. Masure.** 2000. Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* **68:** 5690-5695.
- Gray, B.M., G.M. Converse III, and H.C. Dillon, Jr.** 1980. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. *J. Infect. Dis.* **142:** 923-933.
- Grebe, T., R. Hakenbeck.** 1996. Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **40:** 829-834.
- Griffioen, A., S.W. Franklin, B.J. Zegers, and G.T. Rijkers.** 1993. Expression and functional characteristics of the complement receptor type 2 on adult and neonatal B lymphocytes. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **69:** 1-8
- Griffioen, A.W., E.A. Toebes, B.J. Zegers, and G.T. Rijkers.** 1992. Role of CR2 in the human adult and neonatal in vitro antibody response to type 4 pneumococcal polysaccharide. *Cell immunol.* **143:** 11-22.
- Griffioen, A.W., G.T. Rijkers, P. Janssens-Korpela, and B.J. Zegers.** 1991. Pneumococcal polysaccharides complexed with C3d bind to human B lymphocytes via complement receptor type 2. *Infect. Immun.* **59:** 1839-1845.
- Haagen, I.A., A.J. Geerars, M.R. Clark, and J.G. van de Winkel.** 1995. Interaction of human monocyte Fc gamma receptors with rat IgG2b. A new indicator for the Fc gamma RIIa (R-H131) polymorphism. *J. Immunol.* **154:** 1852-1860.
- Hakenbeck, R., T. Grebe, D. Zähler, and J.B. Stock.** 1999. β -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins. *Mol. Microbiol.* **33:** 673-678.
- Hammerschmidt, S., S.R. Talay, P. Brandtzaeg, and G.S. Chhatwal.** 1997. SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory immunoglobulin A and secretory component. *Mol. Microbiol.* **25:** 1113-1124.
- Hansman, D., and M.M. Bullen.** 1967. A resistant pneumococcus. *Lancet.* **2:** 264-265.
- Hausdorff, W.P., J. Bryant, C. Kloek, P.R. Paradiso, and G.R. Siber.** 2000. The contribution of Specific Pneumococcal Serogroups to Different Disease Manifestations: Implications for Conjugate Vaccine Formulation and Use, Part II. *Clin Infect. Dis. Jan; 30(1):* 122-140. **30:** 122-140.

- Hausdorff, W.P., J. Bryant, P.R. Paradiso, and G.R. Siber.** 2000. Which Pneumococcal Serogroups Cause the Most Invasive Disease: Implications for Conjugate Vaccine Formulation and Use, Part I. *Clin Infect. Dis.* Jan; 30(1): 100-121. **30:** 100-121
- Hendley, J.O., M.A. Sande, P.M. Stewart, and J.r. Gwaltney.** 1975. Spread of *Streptococcus pneumoniae* in families. I. Carriage rates and distribution of types. *J. Infect. Dis.* **132:** 55-61.
- Henrichsen, J.** 1995. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **33:** 2759-2762.
- Hofmann, J., M.S. Cetron, M.M. Farley, W.S. Baughman, R.R. Facklam, J.A. Elliott. et al.** 1995. The prevalence of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Atlanta. *N. Engl. J. Med.* **333:** 481-486.
- Horne, D., A. Tomasz.** 1985. Pneumococcal Forssman antigen: enrichment in mesosomal membranes and specific binding to the autolytic enzyme of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **161:** 18-24.
- Hostetter, M.K.** 1986. Serotypic variations among virulent Pneumococci in deposition and degradation of covalently bound C3b: implications for phagocytosis and antibody production. *J. Infect. Dis.* **153:** 682-693.
- Hostetter, M.K.** 2000. Opsonic and nonopsonic interactions of C3 with *Streptococcus pneumoniae*, p 309-313. In A. Tomasz (ed), *Streptococcus pneumoniae*. Mary Ann Liebert, Inc., Larchmont, N.Y.
- Huizinga, T.W., D. Roos, and A.E. von dem Borne.** 1991. Fc-gamma receptors: mediators, targets and markers of disease. *Baillieres. Clin. Haematol.* **4:** 889-902.
- Hutchinson, B.G., A.D. Oxman, J.S. Shannon, S. Lloyd, C.A. Altmayer, and K. Thomas.** 1999. Clinical effectiveness of pneumococcal vaccine. Meta-analysis. *Can. Fam. Physician.* **45:** 2381-2393.
- Jacobs, M.R.** 1999. Drug-resistant in *Streptococcus pneumoniae*: rational antibiotic choices. *Am J Med.* **106:** 19S-25S.
- Jansen. W.T.M., M. Väkeväinen-Anttila, H. Käyhty, M. Nahm, N. Bakker, J. Verhoeff, et al.** 2001. Comparison of a classical phagocytosis assay and a flow cytometry assay for assessment of the phagocytic capacity of sera from adults vaccinated with a pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Diagn Lab Immunol.* **8:** 245-250.
- Jareo, P. W., L.C. Preheim, P.D. Lister, and M.J: Gentry.** 1995. The effect of ethanol ingestion on killing of *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* by rat neutrophils. *Alcohol Alcohol* **30:** 311-318.
- Johnson, S. E., L. Rubin, S. Romero-Steiner, J. K. Dykes, L. B. Pais, A. Rizvi, et al.** 1999. Correlation of opsonophagocytosis and passive protection assays using human anticapsular antibodies in an infant mouse model of bacteremia for *Streptococcus pneumoniae*. **180:** 133-140.
- Johnston, R.B.Jr.** 1991. Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Rev. Infect. Dis.* **13:** Suppl 6: S509-17.
- Keller, M.A., and E. R. Stiehm.** 2000. Passive immunity in prevention and treatment of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* **13:** 602-14.
- Kim, J.O., and Weiser, J.N.** 1998. Association of intrastain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* **2:** 368-377.

- King, J.C., Jr., P.E. Vink, J.J. Farley, M. Parks, M. Smilie, D. Madore, et al.** 1996. Comparison of the safety and immunogenicity of a pneumococcal conjugate with a licensed polysaccharide vaccine in human immunodeficiency virus and non-human immunodeficiency virus-infected children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **15**: 192-196.
- Kislak, J.W., L.M.B. Razavi, A.K. Daly, and M. Finland.** 1965. Susceptibility of Pneumococci to nine antibiotics. *Am. J. Med: Sci.* **250**: 261-268.
- Klein, E.** 1884. Micro-organisms and disease. *Practitioner*, XXXII, 321-352.
- Klein, J.O.** 1994. Otitis media. *Clin. Infect. Dis.* **19**: 823:833.
- Klugman, K.P.** 1990. Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**: 171-196.
- Knudsen. J. D., K. Fuursted, N. Frimodt-Moller, and F. Espersen.** 1997. Comparison of the effect of cefepime with four cephalosporins against Pneumococci with various susceptibilities to penicillin, in vitro and in the mouse peritonitis model. *Journal Antimicrob Chemother.* **40**: 679-686.
- Knudsen. J. D., N. Frimodt-Moller, and F. Espersen.** 1995. 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.* **39**: 1253-1258.
- Krivan, H.C., D.D. Roberts, and V. Ginsberg.** 1988. Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAc β 1-4Gal found in some glycolipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 6157-6161.
- Lee, C.J.** 1987. Bacterial capsular polysaccharides-biochemistry, immunity and vaccine. *Mol. Immunol.* **24**: 1005-1019.
- Lee, C.J., Y. Takaoka, and T. Saito.** 1987. Maternal immunization and the immune response of neonates to pneumococcal polysaccharides. **9**: 494-510.
- Leowski, J.** 1986. Mortality from acute respiratory infections in children under 5 years of age: global estimates. *World Health Stat. Q.* **39**: 138-144.
- Liñares, J., F. Tubau, and M.A. Domínguez.** 2000. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Spain: an overview in the 1990s, p. 399-407. In A. Tomasz (ed), *Streptococcus pneumoniae*. Molecular biology and mechanisms of disease- update for the 1990s. Mary Ann Liebert, Inc., New York, N.Y.
- Liñares, J., F. Tubau.** 1998. Resistencia a cefalosporinas en infecciones por *Streptococcus pneumoniae*. *Med Clin (Barc).* **110**: 21-24.
- Lipsitch M, Dykes JK, Johnson SE, Ades EW, King J, Briles DE, Carlone GM.** 2000. Competition among *Streptococcus pneumoniae* for intranasal colonization in a mouse model. *Vaccine.* **18**:2895-901
- Liu, Y.S., T.L. Low, A. Infante, and F.W. Putnam.** 1976. Complete covalent structure of a human IgA 1 immunoglobulin. *Science* **193**: 1017-1020.
- Lorian, V., and C.G. Gemmell.** 1991. Effect of low antibiotic concentrations on bacteria: effects on ultrastructure, virulence and susceptibility to immunodefenses. In *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 3rd edn, (Lorian, V., Ed), pp. 493-555. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.

- Lucas, A.H., D.M. Granoff, R.E. Mandrell, C.C. Connolly, A.S. Shan, and D.C.Powers.** 1997. Oligoclonality of serum immunoglobulin G antibody responses to *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide serotypes 6B, 14, and 23F. *Infect. Immun.* **65**: 5103-5109.
- Lund, E.** 1970. Types of Pneumococci found in blood, spinal fluid and pleural exudates during a period of 15 years (1954-1969). *Acta Pathol. Microbiol. Scand. (B). Microbiol Immunol.* **78**: 333-336.
- Lund, E. and J. Henrichsen.** 1978. Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. *Methods Microbiol.*, **12**: 241-262.
- Magnus, T., B.M. Andersen.** 1995. Serotypes and resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae* causing systemic disease in northern Norway. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**: 229-234.
- Marco, F., E. Bouza, J. García de Lomas, L. Aguilar, and the Spanish Surveillance Group for Respiratory pathogens.** 2000. *Streptococcus pneumoniae* in community-acquired respiratory tract infections in Spain: the impact of serotype and geographical, seasonal and clinical factors on its susceptibility to the most commonly prescribed antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* **46**: 557-564.
- Martín, M., M. L. Gómez-Lus, L. Aguilar, P. Martínez, M. J. Giménez, and J. Prieto.** 1997. Effect of clavulanic acid and/or polymorphonuclear neutrophils on amoxicillin bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae*. **16**: 512-516.
- McCullers J.A., E.I. Tuomanen.** 2001. Molecular pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Frontiers of Bioscience.* **6**: 877-889.
- McDaniel, I.S., J. Yother, M. Vijayakumar, L. McGarry, W.R. Guild, and D.E. Briles.** 1987. Use of insertional inactivation to facilitate studies of biological properties of pneumococcal surface protein A (PspA). *J. Exp. Med.* **165**: 381-394.
- McMahon, B.J., A.J. Parkinson, L.Bulkow, M. Davidson, K. Wainwright, P. Wolfe, and G.S. Schiffman.** 1993. Immunogenicity of the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in Alaska Native chronic alcoholics compared with non-alcoholic Native and non-Native controls. *Am. J. Med.* **95**: 589-594.
- Milatovic, D.** 1983. Antibiotics and phagocytosis. *Eur J Clin Microbiol.* **2**: 414-425.
- Miller, P.S., V. Schauf and R.J. Salo.** 1990. Enhanced killing of group B *Streptococci* in vitro by penicillin and opsonophagocytosis with intravenous immunoglobulin. **161**: 1225-1230.
- Mosser, J.L. and A. Tomasz.** 1970. Choline-containing teichoic acid as a structural component of pneumococcal cell wall and its role in sensitivity to lysis by an autolytic enzyme. *J. Biol. Chem.*, **245**: 287-298.
- Muñoz, R., J.M. Musser, M. Crain, D.E. Briles, A. Marton, J.J. Parkinson, et al.** 1992. Geographic distribution of penicillin-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*: characterization by penicillin-binding protein profile, surface protein A typing, and multilocus enzyme analysis. *Clin. Infect. Dis.* **15**: 112-118.
- Musher, D.M.** 1992. Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. *Clin Infect. Dis.* **14**: 801-807.

- Musher, D.M., B. Jr. Johnson, D. A. Watson.** 1990. Quantitative relationship between anticapsular antibody measured by enzyme-linked immunosorbent assay or radioimmunoassay and protection of mice against challenge with *Streptococcus pneumoniae* serotype 4. *Infect Immun.* **58**: 3871-3876.
- Musher, D.M., J.E. Groover, D.A. Watson, J.P. Pandey, M.C. Rodriguez-Barradas, R.E. Baughn, et al.** 1997. Genetic regulation of the capacity to make immunoglobulin G to pneumococcal capsular polysaccharides. *J. Investing. Med.* **45**: 57-68.
- Musher, D.M., J.E. Groover, D.A. Watson, M.C. Rodriguez-Barradas, and R.E. Baughn.** 1998. IgG responses to protein-conjugated pneumococcal capsular polysaccharides in persons who are genetically incapable of responding to unconjugated polysaccharides. *Clin. Infect. Dis.* **27**: 1487-1490.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2001. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 11th informational supplement. NCCLS document M100-S11. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- Nielsen, S.V., U.B. Sorensen, and J. Henrichsen.** 1993. Antibodies against pneumococcal C-polysaccharide are not protective. *Microb. Pathog.* **14**: 299-305.1993
- Noelle, R.J., E.C. Snow.** 1991. T helper cell-dependent B cell activation. *FASEB J.* **5**: 2770-2776.
- Novak, R., and Tuomanen E.** 1999. Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Semin Respir Infect.* **3**: 209-217.
- Novak, R., B. Henriques, E. Charpentier, S. Normark, and E. Tuomanen.** 1999. Emergence of vancomycin tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature.* **399**: 590-593.
- Noya, F.J., C.J. Baker, and M.S. Edwards.** 1993. Neutrophil Fc receptor participation in phagocytosis of type III group B streptococci. *Infect. Immun.* **61**:1415-1420.
- Pares, S., N. Mouz, Y. Petillot, R. Hakenbeck, O. Dideberg.** 1996. X-ray structure of *Streptococcus pneumoniae* PBP 2x, a primary penicillin target enzyme. *Nat. Struct. Biol.* **3**: 284-289.
- Park, M.K., Y. Sun, J.V. Olander, J.W. Hoffman, and M.H. Nahm.** 1996. The repertoire of human antibodies to the carbohydrate capsule of *Streptococcus pneumoniae* 6B. *J. Infect. Dis.* **174**: 75-82.
- Parkinson, A.J., M. Davidson, M.A. Fitzgerald, L.R. Bulkow, and D.J. Parks.** 1994. Serotype distribution and antimicrobial resistance patterns of invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae*: Alaska 1986-1990. *J. Infect. Dis.* **170**: 461-464.
- Paton J. C., P.W. Amdrew, G.J. Boulnois, and T.J. Mitchell.** 1993. Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: the role of pneumococcal proteins, *Annu. Re. Microbiol.* **47**: 89-115.
- Paton, J. C., R. A. Lock, C. J. Lee, J. P. Li, A. M. Berry, T. J. Mitchell, et al.** 1991. Purification and immunogenicity of genetically obtained pneumolysin toxoids and their conjugation to *Streptococcus pneumoniae* type 19F polysaccharide. *Infect Immun.* **59**: 2297-2304.
- Pennington J.E.** 1990. Newer uses or intravenous immunoglobulins as anti-infective agents. *Antimicrob Agents Chemother.* **34**: 1463-1466.
- Pérez-Trallero, E., C. Fernández-Mazarrasa, C. García Rey, E. Bouza, L. Aguilar, J. García de Lomas, et al.** 2001. Antimicrobial susceptibilities of 1,684 *Streptococcus pneumoniae* and 2,039 *Streptococcus pyogenes*

- isolates and their ecological relationships: Results of a 1-year (1998-1999) multicenter surveillance study in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**: 3334-3340.
- Pérez-Trallero, E., M. Alkorta, J.M. García-Arenzana, A. Iturzaeta, and M. Gomariz.** 1998. In-vitro, in-vivo and ex-vivo studies with oral β -lactams against *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Antimicrob Chemother.* **41**: 629-634.
- Platonov, A.E., G.A. Shipulin, I.V. Vershinina, J. Dankert, J.G. van de Winkel, and E.J. Kuijper.** 1998. Association of human Fc gamma RIIa (CD32) polymorphism with susceptibility to and severity of meningococcal disease. *Clin. Infect. Dis.* **27**: 746-750.
- Pomat, W.S., D. Lehmann, R.C. Sanders, D.J. Lewiss, J. Wilson, S. Rogers, et al.** 1994. Immunoglobulin G antibody responses to polyvalent pneumococcal vaccine in children in the highlands of Papua New Guinea. *Infect. Immun.* **62**: 1848-1853.
- Reinert, R.R., A. Kaufhold, O. Kuhnemund, and R. Luttkicken.** 1994. Serum antibody responses to vaccination with 23-valent pneumococcal vaccine in splenectomized patients. *Int. J. Med. Microbiol. Virol: Parasitol. Infect. Dis.* **281**: 481-490.
- Rieux, V., C. Carbon, and E. Azoulay-Dupuis.** 2001. Complex relationship between acquisition of β -lactam resistance and loss of virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal Infect Dis.* **184**: 66-72.
- Rijkers, G.T., L.A. Sanders, and B.J. Zegers.** 1993. Anti-capsular polysaccharide antibody deficiency states. *Immunodeficiency.* **5**: 1-21.
- Robbins, J. B., R. Schneerson, S. C. Szu.** 1995. Perspective: hypothesis: serum IgG antibody is sufficient to confer protection against infectious diseases by inactivating the inoculum. *Journal Infect Dis.* **171**: 1387-98.
- Romero-Steiner, S., D.M. Musher, M.S. Cetron, L.B. Pais, J.E. Groover, A.E. Fiore, et al.** 1999. Reduction in functional antibody activity against *Streptococcus pneumoniae* in vaccinated elderly individuals highly correlates with decreased IgG antibody avidity. *Clin Infect. Dis.* **29**: 281-288.
- Romero-Steiner, S., D. Libutti, L. B. Pais, J. Dykes, P. Anderson, J. C. Whitin, et al.** 1997. Standardization of an opsonophagocytic assay for the measurement of functional antibody activity against *Streptococcus pneumoniae* using differentiated HL-60 cells. *Clin Diagn Lab Immunol.* **4**: 415-422.
- Rosenow, C., P. Ryan, J.N. Weiser, S. Johnson, P. Fontan, A. Ortqvist, and H.R. Masure.** 1997. Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **25**: 819-829.
- Saeland, E., G. Vidarsson, and I. Jonsdottir.** 2000. Pneumococcal pneumonia and bacteremia model in mice for the analysis of protective antibodies. *Microb Pathog.* **29**: 81-91.
- Saeland, E., H. Jakobsen, G. Ingolfsdottir, S.T. Sigurdardottir, I. Jonsdottir.** 2001. Serum samples from infants vaccinated with a pneumococcal conjugate vaccine, PncT, protect mice against invasive infection caused by *Streptococcus pneumoniae* serotypes 6A and 6B. *J Infect Dis.* **183**: 253-260.
- Saladino, R. A., A. M. Stack, G. R. Fleisher, C. M. Thompson, D. E. Briles, L. Kobzik et al.** 1997. Development of a model of low-inoculum *Streptococcus pneumoniae* intrapulmonary infection in infant rats. *Infect Immun.* **65**: 4701-4704.

- Salmon, J.E., S.S. Millard, N.L. Brogle, and R.P. Kimberly.** 1995. Fc gamma receptor IIIb enhances Fc gamma receptor IIa function in an oxidant-dependent and allele-sensitive manner. *J. Clin. Invest.* **95**: 2877-2885.
- Salo, P., K. Laitinen, and M. Leinonen.** 1999. Detection of pneumococcus from whole blood, buffy coat and serum samples by PCR during bacteremia in mice. *APMIS.* **107**: 601-605.
- Sanders, L.A., J.G. van de Winkel, G.T. Rijkers, M.M. Voorhorst Ogink, M. de Jaas, P.J. Capel, and B.J. Zegers.** 1994. Fc gamma receptor IIa (CD32) heterogeneity in patients with recurrent bacterial respiratory tract infections. *J. Infect. Dis.* **170**: 854-861.
- Severin, A., E. Severina, and A. Tomasz.** 1997. Abnormal physiological properties and altered cell wall composition in *Streptococcus pneumoniae* grown in the presence of clavulanic acid. *Antimicrobial Agents Chemother.* **41**: 504-510.
- Shatz, D.V., M.F. Schinsky, L.B. Pais, S. Romero Steiner, O.C. Kirton, and G.M. Carlone.** 1998. Immune responses of splenectomized trauma patients to the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine at 1 versus 14 days after splenectomy. *J. Trauma.* **44**: 760-765.
- Smit, P., D. Oberholzer, S. Hayden-Smith, H.J. Koornhof, and M.R. Hilleman.** 1977. Protective efficacy of pneumococcal polysaccharide vaccines. *JAMA.* **238**: 2613-2616.
- Sniadack, D.H., B. Schwartz, H. Lipman, J. Bogaerts, J.C. Butler, R. Dagan, et al.** 1995. Potential interventions for the prevention of childhood pneumonia: geographic and temporal differences in serotype and serogroup distribution of sterile site pneumococcal isolates from children- implications for vaccine strategies. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **14**: 503-510.
- Sorensen, R.U., L.E. Leiva, P.A. Giangrosso, B. Butler, F.C. Javier, D.M. Sacerdote, et al.** 1998. Response to a heptavalent conjugate *Streptococcus pneumoniae* vaccine. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **17**: 685-691.
- Sorensen, U.B., J. Henrichsen, H.C. Chen, and S.C. Szu.** 1990. Covalent linkage between the capsular polysaccharide and the cell wall peptidoglycan of *Streptococcus pneumoniae* revealed by immunochemical methods. *Microb. Pathog.* **8**: 325-334.
- Spangler, S.K., L. Gengrong, M. R. Jacobs, and P. C. Appelbaum.** 1997. Postantibiotic effect of sanfetrinem compared with those of six other agents against 12 penicillin-susceptible and resistant Pneumococci. *Antimicrob Agents Chemother.* **41**: 2173-2176.
- Stack, A. M., R. Malley, C. M. Thompson, L. Kobzik, G. R. Siber, and R. A. Saladino.** 1998. Minimum protective serum concentrations of pneumococcal anti-capsular antibodies in infant rats. *Journal Infect Dis.* **177**: 986-990.
- Stein, K.E.** 1992. Thymus-independent and thymus-dependent responses to polysaccharide antigens. *J. Infect. Dis.* **165 Suppl 1**: S49-52: 325-334.
- Sternberg, G.M.** 1881. A fatal form of septicemia in the rabbit produced by subcutaneous injection of human saliva: An experimental research. *Natl. Bd. Health Bull.* **2**: 781-783.
- Stoeckle, M.Y., R.G. Douglas, Jr.** 1994. Infectious diseases. *JAMA.* **271**:1677-1679.
- Sundverg-Kövamees, M., T. Holme, and A. Sjögren.** 1994. Specific binding of *Streptococcus pneumoniae* to two receptor saccharide structures. *Microb. Pathog.* **17**: 63-68.

- Tomasz, A.** 1967. Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in *Pneumococcus*. *Science*. **157**: 694-697.
- Tomasz, A.** 1981. Surface components of *Streptococcus pneumoniae*. *Rev. Infect. Dis.* **3**: 190-211.
- Tuomanen, E., H. Liu, B. Hengstler, O. Zak, and A. Tomasz.** 1985. The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. *J. Infect. Dis.* **151**: 859-868.
- Tuomanen, E., R. Rich, and O. Zak.** 1987. Induction of pulmonary inflammation by components of the pneumococcal cell surface. *Am. Rev. Respir. Dis.* **135**: 869-874.
- Tuomanen, E.I., and H.R. Masure.** 1997. Molecular and cellular biology of pneumococcal infection. *Microbial. Drug. Resist.* **3**: 297-308.
- Van der. Pol, W., J.G. van de Winkel.** 1998. IgG receptor polymorphisms: risk factors and host immune responses to them. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**: 479-490.
- Weiser, J.N., R. Austrian, P.K. Sreenivasan, and H.R. Masure.** 1994. Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. *Infect. Immun.* **62**: 2582-2589.
- Yagupsky, P., N. Porat, D. Fraser, F. Prajrod, M. Merires, L. McGee, et al.** 1998. Acquisition, carriage, and transmission of *Pneumococci* with decreased antibiotic susceptibility in young children attending a day care facility in southern Israel. *J. Infect. Dis.* **177**: 1003-1012.