

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

**TERAPEUTICA EXPERIMENTAL DE OSTEOMIELITIS
POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*.
ESTUDIO DE FOSFOMICINA**

TESIS DOCTORAL

Antonio Fe Marqués

Madrid, 1994

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

JOSE PRIETO PRIETO, Catedrático del Departamento de Microbiología I y MANUEL GOMIS GAVILAN, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

INFORMAN: Que D. Antonio Fe Marques, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado, bajo nuestra dirección el trabajo titulado: "Terapéutica experimental de osteomielitis por Pseudomonas aeruginosa. Estudio de fosfomicina." y, considerando que reúne las condiciones necesarias, autorizamos su presentación para optar al grado de Doctor en Medicina.

V.º B.º
EL TUTOR (2)

El Director de la Tesis

Fdo.: _____
(fecha y firma)
D.N.I.:


Fdo: José Prieto Prieto. Fdo: Manuel Gomis
Fdo.: _____ Gavilan
(fecha y firma)
DNI: 7763886 DNI: 21362457
D.N.I.: 29-6-1994

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

JOSE PRIETO PRIETO, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA I DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

INFORMA: Que una vez examinado el Trabajo presentado por D.º ANTONIO FE MARQUES, titulado: Terapéutica experimental de osteomielitis por Pseudomonas aeruginosa. Estudio de fosfomicina.", este Departamento da su conformidad para que dicho Trabajo sea leído y defendido en público con vistas a su aprobación como Tesis Doctoral.

Fecha reunión
Consejo Departamento

1-7-1994

El Director del Departamento


Fdo.: ~~JOSE PRIETO PRIETO~~
(fecha y firma)
29/6/1994

A mis padres.

A María Eugenia.

A Elena.

Deseo desde estas páginas expresar mi agradecimiento a todos aquellos que han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral, y muy especialmente:

A los Profesores Doctores D. José Prieto y D. Manuel Gomis, codirectores de esta Tesis, por la confianza que depositaron en mí y el tiempo y la paciencia que me han dedicado. El Profesor Gomis me inició en el conocimiento de las enfermedades infecciosas, me honra con su amistad y me ha brindado todo su conocimiento y ánimo, sin los cuales nunca este trabajo hubiera visto la luz. El Profesor Prieto me ayudó a adentrarme en el para mí muy difícil mundo de la Microbiología. Ambos me han enseñado a querer y temer a la vez a los “microbios”. A los dos mi más profundo agradecimiento.

A la Dra. Pilar Aparicio y a Ana Herranz, médico, con las que compartí muchas horas de trabajo y esfuerzo en el “ratarío” del Gómez Ulla.

A la Dra. M^a José Alonso, por su colaboración en el procesamiento anatomopatológico de las muestras de hueso.

A la Dra. Tránsito Olay, por su colaboración en el estudio farmacocinético.

A todo el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, y particularmente a la Profesora Gómez-Lus, por su ayuda desinteresada.

A todo el Servicio de Medicina y Cirugía Experimentales del Hospital Militar Central Gómez Ulla, donde se llevó a cabo gran parte de este trabajo.

A mis padres y a María Eugenia, por sus constantes estímulos, empujándome a acabar lo que en ocasiones me parecía inacabable. A mi hija Elena, por aceptar, sin comprender, que no pudiera jugar con ella cuando ella quería.

A todos mis amigos, que me han apoyado y ayudado cuando ha sido preciso, y muy especialmente a Emilio Luengo, excelente cardiólogo además de amigo, que me ha enseñado el manejo de la informática y de la estadística, necesarias para elaborar este trabajo.

INDICE

SIGLAS Y ABREVIATURAS	4
JUSTIFICACION	7
1.- INTRODUCCION	11
1.1.- Osteomielitis.....	12
1.2.- Modelos experimentales de osteomielitis	29
Tabla 1.2.I. Principales modelos animales experimentales de osteomielitis	33
1.3.- Fosfomicina	34
Fig. 1.3.I. Estructura de la fosfomicina	34
Tabla 1.3.I. Concentración sérica máxima tras una sola dosis oral de fosfomicina	46
Tabla 1.3.II. Concentración sérica máxima tras una sola dosis parenteral de fosfomicina	46
2.- OBJETIVOS	47
3.- MATERIAL Y METODOS	49
3.1.- Modelo experimental de osteomielitis por <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	50
Fig. 3.1.I. Material de cirugía	56
Fig. 3.1.II. Anestesia con tiopental sódico	57
Fig. 3.1.III. Anestesia con éter etílico	57
Fig. 3.1.IV. Incisión longitudinal en bloque.....	58
Fig. 3.1.V. Taladro de la metáfisis tibial	58
Fig. 3.1.VI. Inoculación	59
Fig. 3.1.VII. Cierre de la herida.....	59

3.2.- Modelo experimental de osteomielitis por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Tratamiento con fosfomicina.....	60
3.3.- Modelo experimental de osteomielitis por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Niveles óseos de fosfomicina.....	64
3.4.- Niveles séricos de fosfomicina en ratas “Wistar”	68
4.- RESULTADOS	72
4.1.- Modelo experimental de osteomielitis por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	73
Tabla 4.1.I. Resultados microbiológicos	75
Fig. 4.1.I. Resultados microbiológicos	76
Tabla 4.1.II. Resultados histopatológicos.....	77
Fig. 4.1.II. Deformidad ósea	78
Fig. 4.1.III. “Nidus” osteomielítico.....	78
4.2.- Modelo experimental de osteomielitis por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Tratamiento con fosfomicina.....	79
Tabla 4.2.Ia. Resultados microbiológicos.....	83
Tabla 4.2.Ib. Resultados microbiológicos	84
Fig. 4.2.I. Resultados microbiológicos	85
Tabla 4.2.II. Resultados histopatológicos.....	86
Fig. 4.2.II. “Nidus” osteomielítico	87
Fig. 4.2.III. “Nidus” en fase de regresión (28 días de tratamiento con fosfomicina)	87
4.3.- Modelo experimental de osteomielitis por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Niveles óseos de fosfomicina	88
Tabla 4.3.I. Resultados	89
4.4.- Niveles séricos de fosfomicina en ratas “Wistar”	90
Tabla 4.4.I. Resultados	92
Fig. 4.4.I. Curva de absorción-eliminación	93

Fig. 4.4.II. Cinética de eliminación	94
Fig. 4.4.III. Recta de regresión que representa la cinética de eliminación. Representación semilogarítmica	95
5.- DISCUSION	96
5.1.- Modelos experimentales de osteomielitis	97
Tabla 5.1.I. Antimicrobianos utilizados en osteomielitis experimental por <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> (Monoterapia)	111
Tabla 5.1.II. Antimicrobianos utilizados en osteomielitis experimental por <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> (Tratamiento combinado)	112
Tabla 5.1.III. Antimicrobianos utilizados en osteomielitis experimental por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	113
5.2.- Osteomielitis experimental. Tratamiento con fosfomicina	114
5.3.- Niveles óseos y séricos de fosfomicina	128
6.- CONCLUSIONES	135
7.- BIBLIOGRAFIA	137

SIGLAS Y ABREVIATURAS

- ABC_0^{10} : Area bajo la curva desde tiempo 0 hasta 10 h.
- ABC_0^∞ : Area bajo la curva desde tiempo 0 hasta infinito.
- ABC: Area bajo la curva de concentración sérica.
- *B. fragilis*: *Bacteroides fragilis*.
- *B. thetaiotaomicron*: *Bacteroides thetaiotaomicron*.
- C_0 : Concentración sérica en tiempo 0.
- C: Concentración.
- °C: Grados centígrados.
- cc.: centímetro cúbico.
- $C_{m\acute{a}x}$: Concentración sérica máxima.
- CMB: Concentración mínima bactericida.
- CMI_{50} : Concentración mínima que inhibe el crecimiento del 50% de las cepas.
- CMI_{90} : Concentración mínima que inhibe el crecimiento del 90% de las cepas.
- CMI: Concentración mínima inhibitoria.
- cols.: colaboradores.
- csp: cantidad suficiente para.
- cv: coeficiente de variación.
- DL_{50} : Dosis letal para el 50% de la población estudiada.
- *E. coli*: *Escherichia coli*.
- EPA: Efecto postantibiótico.
- fig.: figura.
- g.: gramo.

- h.: hora.
- im: intramuscular.
- iv: intravenoso.
- K_e : Constante de eliminación.
- Kg.: kilogramo.
- l.: litro.
- LCR: Líquido cefalorraquídeo.
- log.: logaritmo decimal.
- m^2 : metros cuadrados.
- mcg.: microgramo.
- mg.: miligramo.
- ml.: mililitro.
- mm.: milímetros.
- m_x : media aritmética.
- Omp: Proteínas de la membrana externa (“Outer membrane protein”).
- *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*.
- *P. mirabilis*: *Proteus mirabilis*.
- p: probabilidad debida al azar.
- PBP: Proteína fijadora de penicilina (“Protein binding penicillin”).
- R^2 : Coeficiente de determinación.
- R: Coeficiente de correlación.
- rpm.: revoluciones por minuto.
- *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*.
- *S. epidermidis*: *Staphylococcus epidermidis*.
- SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.
- SERM: *Staphylococcus epidermidis* resistente a meticilina.
- S_m : Error estándar de la media.
- spp.: especie.

- t.: tiempo.
- $T_{1/2}$: Tiempo de hemivida.
- $T_{m\acute{a}x}$: Tiempo que tarda en alcanzarse la concentración máxima.
- ufc.: unidad formadora de colonia.
- VDRH: Volumen de distribución relativo histoespecífico.

JUSTIFICACION

La osteomielitis crónica es uno de los procesos infecciosos de más difícil planteamiento^{1,2}. Presenta una incidencia en aumento, en relación con determinadas situaciones que dificultan el diagnóstico y agravan su pronóstico^{3,4}: diabetes, insuficiencia circulatoria periférica, casos postraumáticos y postquirúrgicos,... Estas mismas situaciones han condicionado cambios en la etiología, adoptando los microorganismos Gram negativos un mayor protagonismo, llegando en conjunto a sobrepasar a *Staphylococcus aureus* como agentes causales¹⁻³. *Pseudomonas aeruginosa* es, de entre los Gram negativos, una bacteria con especial trascendencia en la infección ósea; su incidencia es cada vez mayor en aislados de osteomielitis, tanto individualmente como en infecciones polimicrobianas^{1,3-6}.

Constituye un proceso de difícil manejo debido a la necesidad de tratamientos muy prolongados, habitualmente por vía iv, con el consiguiente aumento del coste económico y de los problemas psicosociales^{2,3}.

Es así mismo evidente un continuo y progresivo incremento de resistencias bacterianas, al menos en lo referente a dos grupos de antimicrobianos muy ampliamente utilizados en este proceso: betalactámicos y quinolonas fluoradas. Los primeros se enfrentan al grave problema de las betalactamasas^{7,8}, provocan alergias con relativa frecuencia⁹ y, en lo referente a las cefalosporinas, se discute su adecuada concentración en hueso¹⁰. En las quinolonas fluoradas se depositaron grandes esperanzas, y son ciertamente fármacos eficaces, con buena difusión a tejido óseo y espectro adecuado^{10,11}. Sin embargo su efectividad frente a *Staphylococcus spp.* y algunos Gram negativos, incluida *P. aeruginosa*, no ha sido la esperada¹²⁻¹⁴. Por otro lado, su uso está limitado a adultos por su contraindicación en la fase de crecimiento óseo, dado que

experimentalmente se ha comprobado que pueden dañar el cartílago de crecimiento¹⁵. El incremento de resistencias bacterianas frente a los antibióticos de uso más común, condiciona por tanto la búsqueda de otros antimicrobianos con mayor actividad, menor toxicidad y/o mejores propiedades farmacocinéticas¹⁶.

El estudio de la osteomielitis crónica en clínica humana, conlleva problemas diversos de carácter metodológico, con dificultad para la obtención de grupos homogéneos y para un correcto diagnóstico etiológico^{1,3}. Esto condujo al desarrollo de modelos experimentales animales que han demostrado su eficacia^{17,18}. Habitualmente se han empleado conejos, especialmente con *S. aureus*, siendo escasos los realizados con ratas y utilizando Gram negativos. Sin embargo, éste es un animal económico, obtenible con facilidad y en grupos homogéneos, suficientemente grande como para permitir estudios anatomopatológicos, y a la vez muy manejable¹⁷⁻¹⁹.

Fosfomicina es un antibiótico “nacional”, poco valorado en la bibliografía médica anglosajona y de escasa utilización en nuestro país, considerado habitualmente de segunda línea²⁰. Es sin embargo un buen antimicrobiano, con características físicoquímicas y farmacocinéticas que permiten su administración vía parenteral y oral. En la actualidad sólo se admite su uso por esta vía en infecciones urinarias no complicadas y en infecciones intestinales²¹⁻²³, pero la reciente aparición de fosfomicina trometamol tal vez pueda abrir nuevas expectativas para el tratamiento por vía oral de infecciones que requieran altas concentraciones en suero y/o tejidos. Su tolerancia es excelente y produce pocas alergias. Su espectro es bueno frente a Gram positivos y aceptable frente a Gram negativos, con

actividad frente a cepas de *P. aeruginosa*; también la posee frente a anaerobios, excepto bacteroides. Es además activo y estable frente a betalactamasas y tiene actividad sinérgica con otros muchos antimicrobianos^{21,23,24}. Su eficacia en la osteomielitis por *S. aureus* ha sido probada clínica y experimentalmente^{25,26}.

Por todo lo antedicho, ante el reto que plantea la búsqueda de fármacos alternativos a los clásicos para el tratamiento de osteomielitis (resistencias, alergias, intolerancias, niños,...), teniendo en cuenta la importancia de *P. aeruginosa* en este proceso y por la necesidad de disponer de antimicrobianos que permitan realizar terapia secuencial (parenteral-oral), nos hemos planteado el desarrollo de un modelo de osteomielitis experimental en ratas, utilizando *P. aeruginosa* como agente etiológico, y el estudio de la farmacocinética y efectividad clínica de la fosfomicina en el animal de experimentación.

1.- INTRODUCCION

1.1.- OSTEOMIELITIS

1.1.1.- GENERALIDADES

A pesar de los importantes avances logrados en las últimas décadas, la osteomielitis crónica continúa presentando complejos problemas de manejo terapéutico; es causa de grave e importante morbilidad y hay diferencias de opinión acerca de la elección de los antimicrobianos adecuados y de la duración del tratamiento¹⁻⁴.

Constituye un grave problema socioeconómico por la complejidad del diagnóstico y de la terapéutica. También plantea delicadas cuestiones de orden psicosocial. Los pacientes afectos de este proceso pueden llegar a precisar apoyo psiquiátrico, debido a la larga duración de los tratamientos, generalmente por vía parenteral, y a los repetidos actos quirúrgicos, lo cual conlleva prolongadas hospitalizaciones; a esto hay que sumar su habitual dependencia de analgésicos y sedantes y un pronóstico incierto con frecuencia³.

El fenómeno de la adherencia bacteriana a superficies desempeña un papel primordial en la patogénesis de esta enfermedad^{4,27-29}, pues la infección ósea puede considerarse como un proceso por bacterias adherentes, colonizadoras de superficies pasivas, como son los fragmentos de tejido óseo, los materiales de implantes osteoarticulares y en general todos los tejidos desvitalizados. Los microorganismos adherentes colonizan estas superficies pasivas y forman glicocáliz, en cuyo seno se multiplican y están protegidos frente a fagocitos, anticuerpos, complemento y antibióticos. El glicocáliz da nombre a una red de exopolímeros altamente

hidratados que, anclados al lipopolisacárido de la membrana externa en Gram negativos o a los ácidos teicoicos en Gram positivos, envuelven externamente a la bacteria. Este material se fija con facilidad a las glucoproteínas receptoras de las mencionadas superficies pasivas, con firme adhesión, a la vez que se establece también una dependencia interbacteriana entre especies comunes o microorganismos diferentes. De esta manera se constituye un “biofilm” que garantiza su resistencia y agresividad, así como su supervivencia, por medio de la cooperación interbacteriana. Esta concepción ayuda a explicar la tolerancia a muchos tratamientos médicos. Así mismo este “biofilm” constituye uno de los factores de máxima importancia en el desarrollo de la cronicidad en la osteomielitis³⁰. En un estudio sobre aislamientos bacterianos de infecciones osteoarticulares³¹, se detectó producción de glicocálix en el 76’3% de cepas de *S. aureus*, 57’14% de *S. epidermidis*, 50% de *P. aeruginosa* y 75% de *E. coli*.

Por tanto, en la patogénesis de la infección ósea tiene gran importancia la aparición de áreas necróticas y desvitalizadas al progresar la infección. Efectivamente, la osteomielitis aguda es primariamente una infección supurativa, acompañada de edema, congestión vascular y trombosis de pequeños vasos, conduciendo a una micronecrosis ósea; cuando la infección progresa, la vascularización se compromete y se desarrolla macronecrosis con grandes áreas de hueso muerto (secuestros) y proliferación osteoblástica con formación de hueso nuevo reactivo alrededor de la necrosis. Histológicamente, el infiltrado inflamatorio inicial característico de fase aguda (leucocitos polimorfonucleares) va siendo substituído por un infiltrado crónico (mononucleares y células plasmáticas), constituyéndose en la zona de lesión inicial un centro (“nidus”) con polimorfonucleares, depósitos de fibrina y tejido necrótico, rodeado de tejido de granulación con linfo-monocitos y células plasmáticas; éstas están

a su vez rodeadas de un tejido fibroso y hueso nuevo de estructura laminar, elementos que caracterizan la cronicidad³². Hay por lo tanto una gradual transformación de la osteomielitis aguda en crónica. En fase crónica, la vascularización se encuentra muy comprometida, lo cual dificulta aún más el tratamiento antimicrobiano³²⁻³⁴.

La patogenia de la osteomielitis resulta de tal importancia en cuanto a la terapéutica a aplicar, que numerosas clasificaciones de la enfermedad se basan en ella. Waldvogel³²⁻³⁴ la clasificó en tres grupos, ampliamente utilizados todavía: hematógena, por contigüidad y asociada a enfermedades vasculares. Otra clasificación patogénica considera la osteomielitis hematógena o primaria, isquémica (necrosis vascular asociada), contigua, postraumática o postquirúrgica³⁵. También es muy utilizada la clasificación evolutiva, considerando aguda la de menos de dos semanas de evolución, subaguda entre dos y cuatro semanas y crónica la que supera las cuatro; así, Gentry³⁶ la considera, pero añadiendo que cualquier osteomielitis aparentemente aguda que ha presentado algún brote anterior en el mismo territorio, es un brote agudo sobre un fondo crónico, y por lo tanto hay que considerarla crónica a efectos pronóstico-terapéuticos y de manejo.

El diagnóstico de la osteomielitis no es fácil. La radiología convencional es de escasa utilidad, especialmente en casos precoces, por falta de hallazgos radiológicos hasta pasadas 2-3 semanas desde el inicio de la infección. En pacientes diabéticos, las imágenes secundarias a su osteoartropatía son muy similares a las del proceso osteomielítico. En casos postraumáticos y postquirúrgicos, las lesiones óseas acompañantes dificultan gravemente una adecuada valoración. Por ello, con frecuencia hay que acudir a técnicas isotópicas (pirofosfato de Tecnecio⁹⁹, citrato de

Galio⁶⁷, leucocitos marcados con Indio¹¹¹), lo cual encarece el estudio del caso y puede favorecer una prolongada hospitalización^{1,3,4,37,38}.

Tampoco el diagnóstico etiológico, fundamental para un adecuado tratamiento, resulta sencillo. La muestra de más fácil obtención (exudado de fístula) tiene un valor predictivo positivo bajo, del orden del 78% para *S. aureus*, 29% para enterobacterias y 8% para *P. aeruginosa*, de tal manera que el aislamiento de una bacteria diferente de *S. aureus*, carece de significación para predecir cual es el verdadero agente causal³⁹. Se precisa por tanto de muestras obtenidas quirúrgicamente, de las cuales no siempre se puede disponer, o de hemocultivos, que con frecuencia son negativos en este proceso^{3,4,39}.

El tratamiento de la osteomielitis crónica tiene una doble vertiente³: una quirúrgica, que debe cumplir los principios de desbridamiento, obliteración del espacio muerto y restauración de la estabilidad; y otra médica, antimicrobiana, con un fármaco activo frente al microorganismo causal, que alcance una adecuada concentración y sea estable en el hueso, con una duración no inferior a cuatro semanas. Son preferibles los antibióticos bactericidas. También son especialmente útiles los que tienen actividad antiadherente, como clindamicina, impidiendo la unión del glicocálix a fragmentos de fibras, hematomas o materiales inertes. Otras características que debería poseer el antimicrobiano ideal para el tratamiento de esta enfermedad, serían que fuese capaz de actuar en condiciones adversas (pH bajo, anaerobiosis,...), que no se viera influenciado por problemas renales o hepáticos, que produjera escasa o nula toxicidad, que presentara alta indiferencia frente a mecanismos de resistencia bacteriana y que tuviera un bajo precio¹¹.

1.1.2.- ETIOLOGIA

S. aureus continúa siendo el microorganismo más frecuentemente obtenido en aislados de osteomielitis^{2,28,32-34,40-46}.

S. epidermidis se asocia habitualmente a biomateriales²⁸ y a implantes metálicos⁴⁶.

Los bacilos Gram negativos se encuentran presentes con más frecuencia en enfermos con osteomielitis por contigüidad, postraumática y postquirúrgica, de evolución crónica y de desarrollo nosocomial^{2,41,42,47-49}.

P. aeruginosa se aísla especialmente en osteomielitis en adictos a drogas por vía parenteral^{2,43}, heridas por punción en los pies⁵⁰⁻⁵³, infecciones postquirúrgicas^{41,54} y en infecciones en los pies de enfermos diabéticos^{49,55,56}.

Estudios prospectivos de Gomis y cols. durante los últimos años⁶, muestran un claro incremento de bacilos Gram negativos, incluyendo *P. aeruginosa*, como aislados únicos o múltiples en la osteomielitis. En una revisión de las osteomielitis diagnosticadas desde 1984 a 1989 en una Unidad de Enfermos Sépticos⁵, comprobamos que ésta era el principal agente causal en más de un 20% de los 273 pacientes estudiados. La frecuencia de casos postraumáticos, postquirúrgicos y/o con enfermedades asociadas (diabetes, insuficiencia circulatoria de miembros inferiores, úlceras por presión) era proporcionalmente elevada. Para considerar válido el diagnóstico etiológico, se requirió la comprobación del microorganismo en hemocultivo, aspirado, material óseo o protésico obtenido quirúrgicamente o tres muestras sucesivas de exudado de fístula. En una serie de 304 pacientes, Guerrero⁴² encontró que *S. aureus* fue el

principal agente implicado en un 47% de los casos, a gran distancia de *P. aeruginosa* que sólo se aisló en un 6%. Sin embargo, en esta serie, 130 enfermos padecieron una osteomielitis hematógena, mientras que en la nuestra ésta era claramente minoritaria; cuando se analizaron los casos postraumáticos y postquirúrgicos, se comprobó una menor incidencia de estafilococos con incremento de la de los Gram negativos.

Los anaerobios están implicados con cierta frecuencia en las osteomielitis de cráneo y cara, así como en las isquémicas y ampliamente manipuladas^{41,55,57-59}. Clásicamente no se les ha concedido excesiva importancia, presentando una baja incidencia teórica; ésta es atribuible a técnicas inadecuadas para el estudio de las muestras, aceptándose actualmente que pueden estar presentes hasta en un 30% del total de osteomielitis⁴². Además, en los últimos años se han realizado varios modelos experimentales con estos microorganismos, probando su capacidad patógena en la infección ósea⁶⁰⁻⁶².

Otros agentes, como *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella melitensis*, *Candida albicans*, etc. pueden estar también implicados, con mayor o menor frecuencia, en la etiología de la osteomielitis⁴².

Sin embargo, esta clasificación etiológica no deja de ser un tanto artificial, dado que la osteomielitis polimicrobiana es una realidad patente. Su incidencia oscila desde un 21% en la serie de Guerrero⁴², hasta un 42% en un estudio multicéntrico de infecciones óseas de etiologías diversas⁴⁸. Otros autores le atribuyen una frecuencia más elevada, oscilando entre un 30 y un 60% de las osteomielitis crónicas⁶³. Se debe sospechar etiología

polimicrobiana en los casos crónicos manipulados quirúrgicamente, en los secundarios a fracturas abiertas de miembros inferiores, cuando la infección tiene lugar en una extremidad comprometida por insuficiencia vascular o neuropatía periférica, en las osteomielitis por contigüidad—especialmente de los huesos de la cara o de los pies—o siempre que existan datos para pensar en la presencia de anaerobios^{42,63}.

1.1.3.- TRATAMIENTO ANTIMICROBIANO

Cuatro factores mayores influyen en el tratamiento y pronóstico de las osteomielitis⁶⁴: grado de necrosis, condiciones del huésped, lugar y extensión de la infección, y efectos incapacitantes de la enfermedad “per se”. La referencia a estos factores permitiría teóricamente comparar los resultados de diferentes tratamientos o la efectividad de nuevas modalidades terapéuticas. Sin embargo en la práctica no resulta tan sencilla esta comparación, dado que, si bien la osteomielitis aguda hematógena puede beneficiarse de un tratamiento antimicrobiano como única terapéutica, pudiendo con ello curar al enfermo e impedir la cronificación del proceso, en la osteomielitis crónica con frecuencia es necesaria una actitud quirúrgica asociada; a esto hay que añadir los aspectos psiquiátricos, comentados previamente, y rehabilitadores, lo cual multiplica las variables a tener en cuenta⁶⁵.

El éxito terapéutico en la osteomielitis se basa en un tratamiento quirúrgico adecuado, si está indicado, un diagnóstico microbiológico cierto y una prolongada y adecuada terapia antimicrobiana. Cuando sea necesario iniciar un tratamiento antimicrobiano empírico, éste debe cumplir una serie de condiciones⁶⁵: actividad contra microorganismos habituales, capacidad

para difundir y mantener niveles óseos y actividad en dicho tejido. Esto supone tomar en consideración todos los aspectos previamente comentados acerca de la etiología de este proceso, especialmente en lo referente a los microorganismos Gram negativos y a las osteomielitis polimicrobianas. Con respecto a la necesidad de una terapia prolongada, este factor ha de tenerse muy en cuenta para evitar en lo posible problemas de toxicidad y efectos secundarios^{3,4}.

Los antimicrobianos más utilizados para el tratamiento de la infección ósea, han sido los betalactámicos y las quinolonas fluoradas.

Clásicamente se han utilizado las penicilinas isoxazólicas (oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina) para el tratamiento de las osteomielitis por *S. aureus*, y todavía se pueden considerar fármacos de primera elección para este proceso, con la ventaja de permitir terapia secuencial parenteral-oral. Además se ha comprobado su adecuada concentración en hueso⁶⁶⁻⁶⁸. Las cefalosporinas de primera generación son probablemente, en competencia con las penicilinas isoxazólicas, antimicrobianos así mismo de elección en la infección ósea estafilocócica y han probado su eficacia durante años⁶⁹.

Más recientemente, se han venido utilizando modernos betalactámicos, incluyendo cefalosporinas de tercera generación y ureidopenicilinas, con excelentes resultados^{6,48,70-74}. Tienen la ventaja de presentar un amplio espectro antibacteriano, lo cual justifica su uso especialmente por la incidencia creciente de osteomielitis polimicrobiana con participación de Gram negativos. Estos fármacos pueden provocar alergias con relativa frecuencia, habiéndose descrito reacciones alérgicas a la penicilina hasta en un 4% de los pacientes tratados con ésta⁹. La alergia frente a penicilinas se manifiesta incluso en forma de anafilaxia grave, que

si bien es infrecuente, puede tener una elevada mortalidad²¹. Con respecto a las cefalosporinas, se discute su adecuada concentración en hueso, presentando en general un volumen de distribución relativo histoespecífico (VDRH) bajo, lo cual traduce una baja relación entre la concentración ósea y la concentración sérica¹⁰, por lo que su farmacocinética ósea sólo se considera “aceptable”⁷⁵. Muchas de ellas tienen un efecto inductor de betalactamasas, con todos los problemas que de ello deriva⁷⁵. Sin embargo, es cierto que en numerosos estudios clínicos se han mostrado eficaces y útiles^{6,48,70-72,74,76}. También se han utilizado betalactámicos con inhibidores de betalactamasas, con resultados tan sólo discretos en modelos experimentales⁷⁷.

Los monobactámicos, con una farmacocinética ósea bastante similar a la de las cefalosporinas¹⁰, se han utilizado para la osteomielitis por Gram negativos, con buenos resultados⁷⁸. Pueden por tanto jugar un papel importante en el tratamiento de esta enfermedad, máxime a la vista de los problemas que presentan los aminoglucósidos, y que posteriormente se comentarán.

Finalmente imipenem, del grupo de los carbapenémicos, puede estar especialmente indicado en los casos de etiología polimicrobiana, dado su amplio espectro antibacteriano^{48,79}. En estudios clínicos y experimentales ha demostrado su eficacia^{48,80,81}.

Las quinolonas fluoradas fueron inicialmente consideradas como fármacos excelentes para el tratamiento de osteomielitis, especialmente ciprofloxacino⁸². Tienen la gran ventaja de permitir una terapia secuencial parenteral-oral y alcanzan una adecuada concentración en hueso, con un VDRH elevado, habitualmente superior a la unidad¹⁰. Sin embargo, y tal vez en relación con su uso indiscriminado, los últimos años nos han

mostrado un aumento alarmante de las resistencias bacterianas frente a estos antimicrobianos. En un estudio realizado en un hospital de 300 camas⁸³, la sensibilidad de diferentes microorganismos a ciprofloxacino no varió significativamente desde 1984 hasta 1987 (Del 99'6% al 99'5%); sin embargo, tras su libre comercialización, en sólo un año el nivel de resistencia se incrementó hasta un 4%, debido fundamentalmente a *S. aureus* y *P. aeruginosa*. En un estudio multicéntrico reciente estudiando la sensibilidad de los estafilococos aislados de diferentes centros hospitalarios españoles frente a varios quimioterápicos antibacterianos (470 cepas en 1986 y 419 cepas en 1990), se comprobó un gran incremento de la resistencia, especialmente frente a betalactámicos y quinolonas fluoradas (ciprofloxacino pasó del 0'6% al 16% y ofloxacino del 0% al 13'2% para *S. aureus*; para estafilococos coagulasa negativos el incremento fue del 1'1% al 20'9% y del 0'4% al 18'4% respectivamente)¹⁴. En otro estudio sobre 533 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de muestras clínicas, se comprobó que el 14'3% eran resistentes a ciprofloxacino, con una CMI₉₀ de 4 mcg./ml., cifra que cuadruplica la encontrada en trabajos precedentes; ofloxacino y fleroxacino mostraron menor actividad, con una CMI₉₀ de 32 mcg./ml., ocho veces superior a la encontrada en otros estudios⁸⁴. Por otro lado, la demostración experimental de que pueden dañar el cartílago de crecimiento, limita su uso a los adultos¹⁵. Sin embargo hasta ahora se han venido utilizando con éxito, tanto en experimentación animal⁸⁵⁻⁸⁸ como en clínica humana⁸⁹⁻⁹⁹. Efectivamente, con estos fármacos se han logrado buenos resultados globales en la infección osteoarticular, pero su eficacia es menor frente a *P. aeruginosa* y *S. aureus* que frente a otros microorganismos¹⁰⁰.

Otros antimicrobianos han sido utilizados para el tratamiento de las osteomielitis bacterianas. Vancomicina puede ser útil para las infecciones estafilocócicas, especialmente en alérgicos a betalactámicos, pero se ha mostrado poco eficaz en modelos experimentales¹⁰¹, y alcanza bajas concentraciones en hueso¹⁰². Teicoplanina aporta alguna ventaja en actividad intrínseca y farmacocinética, habiéndose mostrado eficaz en la clínica, aunque todavía no existe acuerdo respecto a la dosis óptima a utilizar¹⁰³⁻¹⁰⁵.

Rifampicina ha sido también utilizada, sobre todo en modelos experimentales, generalmente asociada a otros antimicrobianos^{85,106}.

Clindamicina es activa frente a cocos Gram positivos y tiene también acción anaerobicida, habiéndose demostrado su poder antiadherente^{107,108}. Tiene buena biodisponibilidad oral²³ y ha sido utilizada con buen resultado en infecciones osteoarticulares¹⁰⁹. También se ha empleado con éxito para osteomielitis bajo herida en los pies de enfermos diabéticos, generalmente en asociación con otros fármacos¹¹⁰.

Fosfomicina tiene buena actividad frente a estafilococos e incluye Gram negativos en su espectro. Su eficacia en osteomielitis por *S. aureus* ha sido probada clínica y experimentalmente^{25,26}. La experiencia con Gram negativos es mucho más limitada.

Con respecto a los aminoglucósidos, es ya clásico el trabajo de Zimelis y Jackson¹¹¹, en el que demostraron un efecto inhibitor de los iones de calcio sobre la actividad de varios antimicrobianos de este grupo (sisomicina, tobramicina y gentamicina) contra *P. aeruginosa*. Comprobaron que, en presencia de altas concentraciones de antibiótico, al añadir calcio al medio de cultivo se obtenía crecimiento bacteriano. Este efecto no era reversible por aumentar la concentración del aminoglucósido y sólo se ejercía cuando la pared bacteriana estaba intacta. No se comprobó

con otros Gram negativos (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis*). Además, los antimicrobianos de este grupo se inactivan a pH bajo y en condiciones de bajo potencial red-ox^{3,4,11}, situaciones éstas habituales en el foco de infección ósea. Por estos motivos, se considera que los aminoglucósidos están poco indicados para el tratamiento de la osteomielitis.

Metronidazol también se utiliza en este proceso, normalmente asociado a otros antimicrobianos, al menos en la fase inicial, especialmente en osteomielitis en miembros inferiores—sobre todo en pacientes con enfermedades vascular y/o diabética— así como bajo úlcera por presión, dada la frecuente participación de anaerobios en estos casos^{63,72}. En nuestro grupo de trabajo¹¹², comprobamos que la CMI de metronidazol frente a algunos Gram negativos facultativos, descendía a cifras muy inferiores a la previa tras incubación en anaerobiosis, y que su exposición a este antimicrobiano provocaba alteraciones morfológicas en medio anaerobio; ésto podría indicar una moderada actividad del antibiótico contra microorganismos facultativos y acrecentar la actividad de las defensas inespecíficas del paciente en virtud de la alteraciones morfológicas mencionadas.

1.1.4.- OSTEOMIELITIS POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Las bacterias del género *Pseudomonas* se definen como bacilos Gram negativos, móviles, aerobios estrictos—si bien algunas especies pueden emplear como aceptor alternativo el nitrógeno—. Están ampliamente distribuídas por la naturaleza y constituyen unos

microorganismos típicamente oportunistas en el hombre, en el que causan infecciones de marcada gravedad y alta mortalidad; su nivel de resistencia a antimicrobianos y desinfectantes es elevado^{113,114}.

Pseudomonas aeruginosa es la especie tipo y la más frecuentemente patógena para el hombre. Esta acción patógena deriva de diferentes factores de virulencia¹¹⁵: endotoxina del lipopolisacárido, exotoxina A, exoenzima S—que puede actuar como toxina libre o como adhesina—, elastasa, proteasa, hemolisinas—fosfolipasa y lecitinasa—, pigmentos, etc. En su capacidad de adhesión intervienen el mencionado exoenzima S, los pilis o fimbrias y, en algunos casos, el exopolisacárido mucoide¹¹⁶. Es un microorganismo que característicamente se asocia a infecciones con tendencia a evolucionar a la cronicidad, al igual que *S. aureus*¹¹⁷.

La resistencia de *P. aeruginosa* se debe generalmente a la posesión de plásmidos que codifican la producción de enzimas (betalactamasas y enzimas inactivadores de aminoglucósidos fundamentalmente)¹¹⁴ y/o a la hiperproducción de betalactamasas cromosómicas^{118,119}; se han descrito resistencias no mediadas por enzimas, debidas a plásmidos o a mutaciones cromosómicas, especialmente por alteración de las proteínas de la membrana celular externa (Omp), lo cual condiciona un efecto de barrera para el transporte de los antibacterianos a su lugar de actuación. También pueden presentar resistencia por alteración de la diana del antimicrobiano¹¹³, y se ha sugerido la existencia de un sistema de “efflux”¹²⁰.

Esta bacteria tiene unas necesidades nutricionales mínimas, siendo capaz de persistir en el ambiente durante largos períodos de tiempo. Tiene predilección por los lugares húmedos, tanto en su hábitat natural—donde se relaciona estrechamente con suelos y agua—como en la

colonización humana o en los reservorios hospitalarios¹²¹. Vive perfectamente en el suelo de los pasillos y salas de hospital, humidificadores, sueros, líquidos de diálisis, agua del grifo, material de cura y diagnóstico, prótesis, marcapasos, etc.; cualquier medio donde exista cierto grado de humedad puede ser una fuente de *Pseudomonas*. Así, la tasa habitual de sujetos sanos colonizados en mucosa nasal, oídos, axilas, zona perineal, etc. (menor de un 7%), se eleva en ambiente hospitalario hasta un 20%-40%, llegando incluso a sobrepasar el 50% en algunos casos¹²¹. Por este motivo, la infección hospitalaria por *Pseudomonas* puede ocurrir en enfermos que, por cualquier causa, presenten una disminución de la actividad de su sistema defensivo inmunológico o hayan sido sometidos a poliquimioterapia antimicrobiana, con selección de cepas multirresistentes; igualmente puede afectar a sujetos con puertas de entrada abiertas a la infección^{113,114,122}. Estos mecanismos explican la mayor incidencia de osteomielitis por *P. aeruginosa* en adictos a drogas por vía parenteral^{2,43,123}, infecciones óseas postquirúrgicas^{41,54} e infecciones en los pies de enfermos diabéticos^{49,55}. También se aíslan con relativa frecuencia en infecciones de heridas por punción en los pies^{50-53,124}. La patogenicidad de esta bacteria como agente productor de osteomielitis ha sido además probada experimentalmente en conejos¹²⁵. Nosotros la hemos comprobado en ratas¹⁹.

La osteomielitis por *P. aeruginosa* presenta algunas características propias que le confieren cierta individualidad. Se produce por dos mecanismos posibles¹²⁶: diseminación hematógena—en pacientes adictos a drogas por vía iv o a partir de focos urinarios e infecciones pélvicas fundamentalmente—o por contigüidad desde infecciones de tejidos blandos, casos postquirúrgicos o tras traumatismo penetrante,

especialmente por herida punzante. Este último mecanismo incide especialmente en niños^{50,52}.

Las *Pseudomonas* transportadas por la sangre, parecen tener una predilección particular por las estructuras fibrocartilaginosas del esqueleto axial¹²¹. Estas infecciones a menudo involucran el espacio articular, cartílago, membrana sinovial y hueso adyacente, de modo que es difícil determinar si una artritis precede al compromiso óseo o viceversa. El tratamiento de este tipo de osteomielitis con frecuencia puede basarse sólo en el empleo de antimicrobianos, aunque a veces es preciso complementarlo con una adecuada limpieza quirúrgica^{65,121}.

Las infecciones de huesos y articulaciones por *P. aeruginosa* a menudo son más persistentes que las causadas por otros microorganismos, y tienden a ser menos destructivas, o al menos lo hacen más lentamente. En osteomielitis experimental en conejos, utilizando *S. aureus* y *P. aeruginosa*, los hallazgos radiográficos e histopatológicos demostraron una menor agresividad del bacilo Gram negativo¹²⁷. Nosotros también lo comprobamos experimentalmente comparando la osteomielitis por *E. coli* y la producida utilizando *P. aeruginosa*¹⁹; observamos que las lesiones tardaban más tiempo en producirse con ésta, en condiciones controladas y equiparables, que asemejaban la osteomielitis por contigüidad. Es éste un proceso que ocurre en una variedad de contextos clínicos y a menudo es causada por bacterias Gram negativas, entre las cuales *P. aeruginosa* es una de las más frecuentemente aisladas. Se puede presentar tras fracturas abiertas o como complicación de cirugía “limpia”, necesaria en el manejo de fracturas cerradas de huesos largos. También puede adquirirse en el contexto de una herida punzante en los pies o como complicación de una neuropatía periférica—con o sin compromiso vascular asociado—con necrosis por presión de la piel y tejidos blandos suprayacentes al hueso,

caso de los enfermos diabéticos; así mismo puede presentarse tras cirugía cardíaca, en forma de osteomielitis esternal¹²¹. En estos casos, el tratamiento antimicrobiano debe llevar asociado de forma prácticamente constante una adecuada terapéutica quirúrgica, si bien puede permitir, si se aplica correctamente, disminuir la extensión de las amputaciones cuando éstas son necesarias, o incluso evitarlas por completo, limitándose la cirugía a realizar una correcta limpieza⁶⁵.

Como ya se ha comentado previamente, las variables a tener en cuenta en esta enfermedad son tantas que dificultan la interpretación y comparación de las diferentes terapéuticas aplicadas, por lo que es difícil contar con pautas generales de tratamiento para la osteomielitis contigua crónica por *P. aeruginosa*. Se han manejado diferentes antimicrobianos, fundamentalmente betalactámicos y quinolonas fluoradas. De entre los primeros, se ha ensayado aztreonam con buen resultado en algún estudio¹²⁸, pero el más ampliamente utilizado ha sido ceftazidima, que ha demostrado su utilidad en la clínica^{6,129}, aunque ha fracasado en algún modelo experimental¹³⁰. Cefpiroma, una nueva cefalosporina de 4ª generación aún no comercializada en nuestro país, se ha mostrado efectiva en estudios preliminares experimentales de osteomielitis por *Pseudomonas*¹³¹. De entre las quinolonas, la mayor eficacia parece corresponder a ciprofloxacino, seguido de pefloxacino¹³²⁻¹³⁵; también se ha utilizado ofloxacino^{136,137}. Si bien parece ser que no existe resistencia microbiana extracromosómica para estos fármacos¹¹³, sí se ha descrito la aparición de resistencias durante el tratamiento de infecciones graves por *P. aeruginosa* incluídas osteomielitis, tanto para ciprofloxacino^{12,97,138,139}, como para ofloxacino¹⁴⁰⁻¹⁴² y para otros antibacterianos^{48,143}. En un reciente estudio multicéntrico español de bacteriemias por *P. aeruginosa*¹⁴⁴, se detectó aparición de resistencia durante el tratamiento a

diferentes fármacos en aproximadamente un 10% de los pacientes. Por estos motivos, y a pesar de que se ha intentado utilizar monoterapia para minimizar los efectos secundarios, dada la larga duración de la terapéutica en la infección osteoarticular, muchos autores preconizan el tratamiento combinado con dos antimicrobianos que tengan diferente mecanismo de acción—incluso aunque la cepa aislada sea sensible a cada uno de ellos individualmente—cuando el agente causal es *P. aeruginosa*, intentando evitar este fenómeno de aparición de resistencias. En estudios comparativos entre quinolonas y ceftazidima en infecciones por *P. aeruginosa*, incluyendo osteomielitis, han demostrado una eficacia similar^{145,146}.

1.2.- MODELOS EXPERIMENTALES DE OSTEOMIELITIS

Un diagnóstico difícil y un tratamiento complejo, características éstas de la osteomielitis crónica, plantean la búsqueda de modelos animales que permitan un adecuado estudio del proceso y ensayos terapéuticos². Estos han demostrado sobradamente su eficacia^{17,18,147,148} (Tabla 1.2.I).

El modelo ideal debería reunir una serie de características: ser semejante a la osteomielitis humana, reproducible, de bajo coste y de cómodo manejo. Así mismo, sería de desear que los animales fueran obtenibles fácilmente en grupos homogéneos y resistentes a los tratamientos antibióticos.

Los más utilizados han sido los modelos ensayados en conejos. Es clásico el realizado por Norden y Kennedy¹⁴⁹ en 1970, basado en el descrito por Scheman y cols.¹⁵⁰ en 1941. La infección fue reproducible, y los cambios histopatológicos y radiológicos fueron similares a los observados en el hombre; sin embargo la tasa de mortalidad, atribuída a la terapia antibiótica a largo plazo, fue elevada. Por este motivo, Zak y cols.¹⁵¹ en 1982 idearon un modelo de osteomielitis crónica en ratas, que son más resistentes al tratamiento antibiótico, de bajo coste y muy manejables. Tanto en uno como en otro animal, la enfermedad desarrollada fue equiparable a la osteomielitis crónica por contigüidad.

En perros, los modelos de mayor interés son los de Deysine y cols.¹⁵² y Fitzgerald¹⁵³. Ambos corresponden a osteomielitis subaguda, siendo el primero equiparable en su origen a la osteomielitis hematógena y el segundo a la osteomielitis subaguda por foco contiguo. Los modelos en

perros tienen la ventaja de permitir desarrollar experiencia quirúrgica; además resisten bien los efectos tóxicos de los antibióticos. En su contra tienen su elevado coste y la dificultad en obtener grupos homogéneos¹⁷.

Otros modelos han utilizado diferentes animales, como pollos¹⁵⁴, cobayas¹⁵⁵, e incluso monos¹⁵⁶.

Respecto a los microorganismos empleados, el más habitual ha sido el *S. aureus*, siendo más escasos los realizados con Gram negativos; en particular con anaerobios, no se ha experimentado hasta fechas muy recientes (Tabla 1.2.I). Hasta el desarrollo del nuestro en 1989¹⁹, no se habían descrito modelos en ratas con Gram negativos. Nosotros desarrollamos éste con ratas “Wistar”, utilizando como base el método de Zak, modificación a su vez del de Norden, y comprobamos el poder patógeno de *E. coli* y *P. aeruginosa*, así como la evolución de las lesiones anatomopatológicas. Concluimos que el modelo podía resultar válido para realizar estudios de tratamiento antimicrobiano y comprobamos su rentabilidad ensayando diferentes terapéuticas: cefotaxima frente a *E. coli*^{157,158}, y piperacilina¹⁵⁹, imipenem⁸⁰ y ceftazidima¹⁶⁰ frente a *P. aeruginosa*.

Sin embargo, cuatro aspectos deben hacer mirar con cierta cautela los modelos experimentales animales de osteomielitis³⁵:

- 1.- Para conseguir que el inóculo prenda, habitualmente es necesaria la utilización de sustancias esclerosantes o procedimientos quirúrgicos^{149,161}. Sólo en fechas recientes se ha logrado un modelo de osteomielitis experimental sin agente esclerosante¹³⁰, aunque al utilizar un taladro se produce una quemadura térmica que puede actuar como tal.

- 2.- Los inóculos deben ser altos.

3.- Los secuestros pueden desaparecer de forma espontánea durante el tratamiento.

4.- La valoración del éxito puede hacerse por disminución del número de unidades formadoras de colonias por gramo de hueso, sin lograr la definitiva esterilización.

Además, en ocasiones se ha comprobado falta de correlación entre el tratamiento experimental y su utilización en la clínica, mereciendo la pena destacar el 91% de fracasos con vancomicina en el ensayo de Norden y Shaffer¹⁰¹, posteriormente corroborado por Henry y cols.⁸⁵, o el fracaso con ceftazidima descrito por Nelson y cols.¹³⁰, situaciones que son diferentes en clínica humana.

También se han utilizado estos modelos animales para estudiar los niveles de antimicrobiano en el foco de infección, por ser éste un dato de gran interés a la hora de valorar la posible eficacia terapéutica¹⁰. Desde sus primeros trabajos en la década de los 70, Norden complementa los ensayos terapéuticos con el estudio de las concentraciones de antibióticos en el tejido óseo^{106,162-164}. Debe diferenciarse el hueso sano del enfermo, y, si es posible, la cortical de la esponjosa. También la técnica empleada, fundamentalmente el procedimiento microbiológico y la cromatografía líquida de alta presión, dará mayor o menor fiabilidad; ambas tienen ventajas e inconvenientes. Así, a favor de la cromatografía estaría que es más precisa, pero a favor del método microbiológico se puede invocar que mide el nivel en función de la efectividad real del fármaco, incluyendo posibles metabolitos activos¹⁰. Así mismo es de resaltar que debe intentarse siempre la descontaminación sanguínea de la muestra, para evitar niveles falsamente elevados.

Por otra parte, estos modelos han sido igualmente empleados para ensayar otras terapéuticas no antimicrobianas que puedan ayudar en el tratamiento del proceso. Este es el caso del estudio de Dekel y Francis¹⁶⁵, que plantearon la administración de antiinflamatorios como terapia adyuvante al tratamiento antibiótico, por su capacidad para disminuir los niveles de prostaglandinas en el foco óseo, lo cual puede disminuir a su vez la destrucción del hueso enfermo y favorecer una más rápida curación.

AÑO (Cita)	AUTORES	ANIMAL	MICROORGANISMOS
1941 (150)	Scheman y cols.	Conejo	<i>S. aureus</i>
1970 (149)	Norden y Kennedy	Conejo	<i>S. aureus</i> <i>P. mirabilis</i>
1973 (161)	Andriole y cols.	Conejo	<i>S. aureus</i>
1974 (166)	Van Windergeren y cols.	Conejo	<i>P. aeruginosa</i>
1977 (167)	Crane y cols.	Conejo	<i>S. aureus</i>
1980 (125)	Norden y Keleti	Conejo	<i>P. aeruginosa</i>
1981 (165)	Dekel y Francis	Conejo	<i>S. aureus</i>
1986 (148)	Mader y Wilson	Conejo	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> <i>P. mirabilis</i>
1990 (168)	Mayberry-Carson y cols.	Conejo	Mixta: (<i>S. epidermidis</i> y <i>B. thetaiotaomicron</i>) <i>B. fragilis</i>
1991 (60)	Johansson y cols.	Conejo	
1991 (61)	Lambe y cols.	Conejo	Mixta (<i>S. epidermidis</i> y/o <i>B. thetaiotaomicron</i>)
1982 (151)	Zak y cols.	Rata	<i>S. aureus</i>
1985 (169)	Rissing y cols.	Rata	<i>S. aureus</i>
1989 (19)	Gomis y cols.	Rata	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>
1990 (130)	Nelson y cols.	Rata	<i>P. aeruginosa</i>
1976 (152)	Deysine y cols.	Perro	<i>S. aureus</i>
1983 (153)	Fitzgerald	Perro	<i>S. aureus</i>
1983 (154)	Emslie y Nade	Pollo	<i>S. aureus</i>
1984 (155)	Passl y cols.	Cobaya	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>
1989 (156)	Wannfors y Hammarstrom	Mono	Mixta (Flora oral)

TABLA 1.2.I: Principales modelos animales experimentales de osteomielitis.

1.3.- FOSFOMICINA

1.3.1.- GENERALIDADES

La fosfomicina es un antibiótico natural, de acción bactericida y de amplio espectro.

Fue aislada en 1966 de una cepa de *Streptomyces fradiae*, obtenida de una muestra de suelo de la provincia de Alicante, y posteriormente de *Streptomyces viridochromogenes* y *Streptomyces wedmorensis*. Inicialmente la fosfomicina fue conocida con el nombre de fosfonomicina¹⁷⁰.

Es el ácido 1,2-epoxipropilfosfónico, derivado del ácido propiónico; no está relacionado con otros antibióticos¹⁷¹ (Fig. 1.3.I).

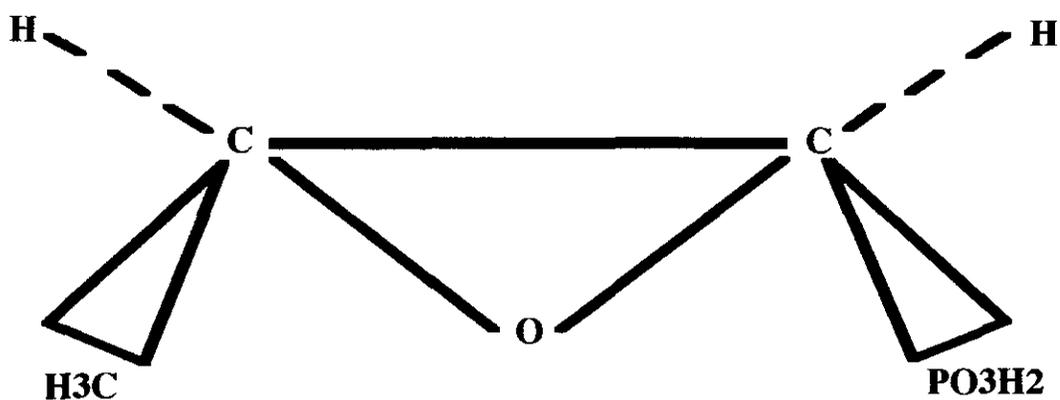


Fig. 1.3.I: Estructura de la fosfomicina.

La molécula de fosfomicina presenta unas características peculiares, como es el estar formada por un grupo epóxido al que se une un grupo fosfórico cargado negativamente y que es determinante para su acción antibacteriana. Además, el átomo de fósforo está directamente unido al átomo de carbono, sin puente intermedio de oxígeno como es habitual en los compuestos orgánicos fosforados¹⁷¹.

Tiene un peso molecular que es casi el menor de entre todos los antimicrobianos (138'1), pues sólo la cicloserina, la isoniacida y la flucitosina lo tienen más bajo^{172,173}.

Las sales disódica y cálcica, que se utilizan en clínica vía parenteral y oral respectivamente, se obtienen substituyendo los dos átomos de hidrógeno del radical fosfórico por otros tantos de sodio y uno de calcio. La sal de trometamol, recientemente comercializada para uso oral, se obtiene agregando al radical fosfórico una molécula de trometamina. La trometamina (tris-hidroximetil-aminometano) es un tampón sintético para uso a corto plazo¹⁷⁴; da lugar a que el peso molecular de la fosfomicina casi se duplique, sin contribuir ni interferir con su acción antibacteriana²¹.

Considerado en general como un antibiótico de segundo orden²⁰, con frecuencia no es citado en los textos cuando se habla de antimicrobianos, especialmente en aquellos de influencia anglosajona. Su escasa utilización se puede comprobar observando como ni siquiera se menciona como grupo o fármaco independiente en estudios estadísticos españoles^{175,176}. Sin embargo está admitida su indicación en infecciones graves por microorganismos sensibles—sepsis, endocarditis, infecciones osteoarticulares, etc.—, como alternativa a otros antibióticos^{24,177}. Otras indicaciones de la fosfomicina incluyen infecciones urinarias—única indicación admitida para fosfomicina trometamol y en dosis única—,

intestinales, genitales, broncopulmonares, oculares, cutáneas y de tejidos blandos, otorrinofaringolaringológicas, meningitis, peritonitis, empiema pleural y fiebre tifoidea²¹. También ha sido utilizada con éxito en pacientes con fibrosis quística¹⁷⁸. Por vía oral, tan sólo se admite actualmente su uso para infecciones urinarias no complicadas, intestinales, y de la piel y tejidos blandos^{22,171,179}.

Actúa impidiendo la formación de la pared celular, por bloqueo de la síntesis de los precursores del peptidoglicano. Tiene un efecto bactericida rápido sobre las células bacterianas sensibles que se encuentren en fase de crecimiento²³.

Sus efectos secundarios son escasos y de poca gravedad. La DL₅₀ en el ratón (vía intraperitoneal) es de 4 g./kg. para la sal sódica y de 20 g./kg. para la cálcica¹⁸⁰. Puede, ocasionalmente y por vía oral, producir heces blandas, diarrea, náuseas, vómitos y sensación de quemazón anal. Con la administración de 2 gramos por día repartidos en 4 dosis, durante 28 días, en perros, tan sólo se demostró la aparición de una disbacteriosis intestinal que se recuperó totalmente a las dos semanas de finalizado el tratamiento²¹.

También se han descrito eosinofilia, trombocitosis y discretas elevaciones de transaminasas. Puede favorecer la aparición de hipernatremia o hipokaliemia en perfusión intravenosa¹⁷¹.

Desde el punto de vista de las alergias, no están descritas ni anafilaxia ni hipersensibilidad grave, aunque se han comunicado algunos casos de ligero exantema o urticaria que generalmente no obligaron a suspender el tratamiento²¹.

Carece de acción teratogena para el conejo y el ratón, considerándose un fármaco seguro en la lactancia y probablemente en el embarazo^{23,179}.

La administración parenteral es dolorosa vía im, por lo que el solvente se prepara con xilocaína; en algunos enfermos se ha descrito induración en el sitio de la inyección. Por vía iv puede producir flebitis, por lo que se aconseja su administración diluída, discontinua lenta o bien mediante perfusión continua²¹.

1.3.2.- FARMACOCINETICA

La sal cálcica de fosfomicina, administrada por vía oral, resulta parcialmente inactivada por el jugo gástrico, presentando una absorción incompleta (20-30%), con una biodisponibilidad del 20 al 30% de la dosis administrada^{21,23}. Las concentraciones sanguíneas máximas se alcanzan a las 2-4 horas, dependiendo de la dosis (Tabla 1.3.I). Con administraciones sucesivas, se observa un efecto acumulativo, lográndose un nivel plasmático continuo de 6-8 mcg./ml. a partir de la cuarta toma de una dosis de 500 mg. cada 6 horas²¹. Estos niveles relativamente bajos son la causa de que su uso tenga unas indicaciones limitadas¹⁷¹. La fosfomicina trometamol es mucho mejor absorbida por vía oral que la sal cálcica (50-60%), de forma que su biodisponibilidad alcanza cifras próximas al 60% de la dosis administrada²¹. Su cinética de absorción oral es dosis dependiente (Tabla 1.3.I). Con la administración continuada de 2 gramos cada 12 horas se logra un nivel mantenido de 24 mcg./ml.²⁴

La fosfomicina disódica por vía intramuscular tiene una absorción rápida, con concentraciones máximas al cabo de una hora, pero

los niveles que se alcanzan son casi la mitad que los conseguidos vía intravenosa²¹ (Tabla 1.3.II). Con dosificaciones sucesivas de un gramo administrado cada 6 horas por vía im, se logran picos de 30 a 40 mcg./ml. La infusión continua iv de 500 mg. a la hora produce un nivel constante de 60 mcg./ml. La administración de 4 gramos cada 6 horas iv proporciona concentraciones máximas de hasta 253 mcg./ml.²¹

La hemivida de la fosfomicina es de 2 horas. No se conjuga con las proteínas plasmáticas. Su volumen de distribución aparente es de 20 a 22 l./1.73 m² de superficie corporal¹⁷². Estos datos sugieren una buena difusión al líquido intersticial e intracelular, con buena penetración en tejidos²⁰. Efectivamente, se alcanzan altas concentraciones en orina, esputo, linfa, líquidos orgánicos (pleural, peritoneal, pericárdico, sinovial), humor acuoso, pulmón, riñón y hueso²¹. Atraviesa la barrera hematoencefálica, siguiendo un curso bastante paralelo con el de los niveles plasmáticos, aunque los niveles máximos en LCR se alcanzan una hora más tarde que en sangre¹⁸⁰.

La fosfomicina no es metabolizada en el organismo, y se elimina fundamentalmente por la orina y las heces. Existe una recirculación o ciclo enterohepático tras la administración del antibiótico, tanto por vía parenteral como por vía oral. La eliminación renal se efectúa por filtración glomerular, sin que haya secreción ni reabsorción tubular²¹.

1.3.3.- ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La fosfomicina es un antibiótico de amplio espectro, que incluye cocos Gram positivos y Gram negativos, y bacilos Gram negativos aerobios y facultativos, incluida *Pseudomonas aeruginosa*¹⁸¹.

Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis de la pared celular, actuando en la primera etapa de la biosíntesis del peptidoglicano. Compite con el fosfoenolpiruvato, por analogía estructural, por la enzima uridíndifosfo-N-acetilglucosamina-3-fosfoenolpiruvato-transferasa, uniéndose a ella de forma irreversible; esta enzima es la encargada de la incorporación del fosfoenolpiruvato a la uridíndifosfo-N-acetilglucosamina, para originar el ácido uridíndifosfo-N-acetilmurámico¹⁷⁹.

Tiene un efecto bactericida rápido sobre las células bacterianas sensibles que se encuentren en fase de crecimiento²³.

Penetra en la célula bacteriana mediante dos sistemas de transporte activo: el sistema L-alfa-glicerolfosfato, constitutivo en las bacterias sensibles a la fosfomicina, y el sistema hexosa-fosfato, que se observa en algunas especies bacterianas tras su inducción por una hexosa-fosfato, y particularmente por la D-glucosa-6-fosfato. Por este motivo, en los medios de cultivo y/o en los discos de fosfomicina para antibiograma, se suele añadir glucosa-6-fosfato¹⁷⁹. Además, se considera que la actividad determinada “in vitro” en presencia de glucosa-6-fosfato, es la que refleja mejor la actividad antibacteriana obtenida “in vivo”^{171,182}.

Por otra parte, está demostrada su penetración en las células fagocitarias, donde alcanza concentraciones elevadas, presentando una actividad intracelular próxima a la de la rifampicina^{171,183}. Esta penetración no altera la capacidad de ingestión y destrucción de las mencionadas células, en estudios “in vitro”^{184,185}.

En un grupo de estudio internacional para la estandarización de la sensibilidad a la fosfomicina¹⁸², se establecieron en 1983 dos puntos de

corte (“break points”): 16 y 64 mcg./ml. Así, se consideran sensibles las cepas ante las que fosfomicina presenta una CMI \leq 16 mcg./ml.; moderadamente sensibles, CMI entre 32 y 64 mcg./ml.; resistentes, CMI \geq 128 mcg./ml. Estos datos se establecieron para el supuesto de que la sensibilidad se estudiara con discos conteniendo 50 mcg. de fosfomicina y 50 mcg. de glucosa-6-fosfato, en presencia de 25 mg. de glucosa-6-fosfato en el medio de cultivo (agar Müller-Hinton).

Muestra en general una mayor efectividad frente a bacterias Gram positivas que Gram negativas. La actividad que presenta frente a estafilococos, incluyendo habitualmente cepas productoras de betalactamasas y a menudo cepas resistentes a meticilina²³, es independiente de su respuesta a penicilinas y cefalosporinas. También es activa, aunque en menor grado, frente a neumococos y estreptococos, con alto grado de resistencia entre enterococos^{21,186}.

Entre los Gram negativos, tiene buena actividad frente a *E. coli*, *Salmonella*, *Shiguella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Neisseria* y *Haemophilus*. Cerca del 50% de las cepas de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus* y *P. aeruginosa* son sensibles²³. También presenta actividad frente a cepas de *Bordetella*, *Pasteurella multocida*, *Serratia* y *Citrobacter*²¹.

Por lo que respecta a los anaerobios, es inactiva frente a *Bacteroides* spp. y activa frente a casi todas las demás bacterias^{21,23}.

Pseudomonas aeruginosa tiene una sensibilidad a fosfomicina que varía enormemente entre unos y otros hospitales y entre diferentes estudios¹⁷¹. Así, podemos encontrar descrita una CMI₉₀ de 14'4 mcg./ml.¹⁷¹ o entre 32 y 64 mcg./ml.¹⁸⁷; una CMI₆₇ de 64 mcg./ml.¹⁸² o una CMI₅₀ de 32 mcg./ml. con una CMI₉₀ de 256 mcg./ml.¹⁸⁸.

Presenta acción sinérgica con betalactámicos, aminoglucósidos, cloranfenicol, tetraciclinas, eritromicina, cotrimoxazol y quinolonas^{21,189}. El tratamiento combinado con aminoglucósidos, además de producir sinergismo, disminuye la nefrotoxicidad de éstos^{179,190}.

Sobre estafilococos^{24,191-194} tiene acción sinérgica con aminoglucósidos, cloxacilina, cefalosporinas, vancomicina, rifampicina y quinolonas. Sobre SARM, se ha comprobado sinergismo con amikacina, cloxacilina, rifampicina y vancomicina¹⁹³. Frente a enterobacterias multirresistentes, se ha observado con modernos betalactámicos (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima y aztreonam)¹⁹¹. En particular la asociación de cefotaxima y fosfomicina ha demostrado ser altamente sinérgica, tanto “in vitro” como “in vivo”, frente a estafilococos, incluidos SARM, y enterobacterias¹⁹⁵⁻¹⁹⁷.

Respecto a la acción sinérgica con los betalactámicos, en 1986 se comprobó que la agregación de fosfomicina, en una concentración igual a 1/4 de la CMI, a un cultivo de SARM, redujo considerablemente la cantidad de ciertas PBP, y especialmente de la PBP característica de las cepas resistentes a meticilina; la tasa de las PBP que son blanco esencial de los betalactámicos, disminuyó muy poco. Fosfomicina por tanto restituiría su actividad a los betalactámicos asociados¹⁹⁷.

La asociación con rifampicina no se considera recomendable por la alta tasa de mutaciones observada con los dos antimicrobianos¹⁷¹.

Sobre *Pseudomonas aeruginosa*^{24,189,192,196,198,199}, tiene acción sinérgica con aminoglucósidos, ureidopenicilinas, cefalosporinas de 3ª generación, imipenem, carbenicilina, aztreonam y quinolonas fluoradas.

No se dispone de datos acerca del posible efecto postantibiótico de fosfomicina²⁰⁰, aunque estudios que se están llevando a cabo

actualmente en nuestro Departamento de Microbiología (comunicación personal), parecen indicar un moderado EPA de fosfomicina frente a *E. coli*.

Con respecto a la resistencia a fosfomicina, en casi todas las poblaciones bacterianas susceptibles existen mutantes espontáneos resistentes en un solo escalón a este antibiótico, con una frecuencia alta ($1/10^4$ a $1/10^6$). Esta resistencia es debida a la incapacidad de la fosfomicina para penetrar en la célula bacteriana, por carencia de los sistemas de transporte del L-alfa-glicerolfosfato y la D-glucosa-6-fosfato. Estos mutantes son metabólicamente defectivos y ostentan una disminución o pérdida de su virulencia, al menos en infecciones experimentales^{21,171}.

Además de esta resistencia natural, existe otra adquirida, igualmente por alteración del transporte y posiblemente cromosómica, por la cual cepas originalmente sensibles adquieren, en el enfermo en tratamiento, niveles de resistencia 16 a 256 veces superiores, sin que se puedan considerar mutantes defectivos, ya que se desarrollan con idénticas características que las estirpes originales y mantienen su virulencia, pues se aíslan en casos de recaídas o fracasos terapéuticos²¹. Esta resistencia adquirida se ha visto con mayor frecuencia en tratamientos con monoterapia¹⁷¹, por lo que cuando se emplea fosfomicina frente a microorganismos que desarrollan resistencia con relativa frecuencia, como *P. aeruginosa*^{143,144}, está indicado su uso en asociación con otros antimicrobianos^{171,181}. La resistencia aparecida en tratamientos con fosfomicina, ha sido descrita con diferentes microorganismos, incluida *P. aeruginosa*^{25,201-203}.

También se ha comunicado la resistencia debida a pérdida de la afinidad de la enzima uridíndifosfo-N-acetilglucosamina-3-

fosfoenolpiruvato-transferasa^{24,204}, que es así capaz de discriminar entre el ácido fosfoenolpirúvico y la fosfomicina. Este mecanismo es también de origen cromosómico.

Respecto a la resistencia extracromosómica, gobernada por plásmidos, igualmente ha sido descrita^{187,205}. Recientemente ha sido purificada la enzima fosfomicina-glutation-S-transferasa, que cataliza la formación de un complejo fosfomicina-glutation, el cual carece de actividad antibacteriana. El gen responsable de la síntesis de esta enzima se localiza en un trasposón. Se ha detectado en cepas ambientales y hospitalarias²⁰⁴.

La fosfomicina no posee resistencia cruzada con ningún otro antibiótico o quimioterápico^{21,171}.

Con el paso del tiempo, el perfil de sensibilidad a fosfomicina no parece haber disminuído de forma importante¹⁷¹. Frente a estafilococos, en un estudio reciente se comprobó incluso una disminución del nivel de resistencia, en particular con *Staphylococcus coagulasa* negativos, mientras que *S. aureus* se mantuvo bastante estable¹⁴. Con respecto a *P. aeruginosa*, hay pocos estudios donde se estudie su sensibilidad a fosfomicina, pero en un trabajo publicado en 1986¹⁸⁸ se informó que la sensibilidad desde 1973 a 1984 sólo disminuyó desde un 71% hasta un 69%.

1.3.4.- FOSFOMICINA EN LA OSTEOMIELITIS

En osteomielitis experimental tan sólo hemos encontrado dos estudios realizados con fosfomicina. Olay y cols.²⁶ en 1983 inocularon *S. aureus* a 40 conejos utilizando el método descrito por Norden y Kennedy¹⁴⁹. Los animales fueron tratados con cefazolina y/o fosfomicina.

Posteriormente, Guerrero²⁵, empleando el mismo método y también con conejos, realizó un estudio utilizando *E. coli* como agente causal, y tratando posteriormente a los animales con fosfomicina en monoterapia.

No se ha utilizado fosfomicina en osteomielitis experimental por *Pseudomonas aeruginosas*, ni en modelos diferentes del de Norden y Kennedy¹⁴⁹ en el conejo, hasta nuestro trabajo.

En clínica humana, no son muy abundantes los estudios publicados sobre el uso de fosfomicina en la osteomielitis. En general se trata de enfermedad crónica, aunque hay alguna comunicación sobre osteomielitis aguda hematógena tratada satisfactoriamente con este antibiótico²⁰⁶. También hay un trabajo de Hernández²⁰⁷, que la utiliza profilácticamente en fracturas óseas u operaciones traumatológicas, con excelentes resultados.

Por otro lado, el microorganismo más habitualmente implicado en la osteomielitis tratada con fosfomicina ha sido *S. aureus*, siendo escaso el uso de este antimicrobiano frente a otras bacterias.

Fernández-Valencia y cols.²⁰² trataron 37 enfermos con monoterapia, logrando un 78% de curaciones. En el 90% de los casos se aisló *S. aureus*, sólo o asociado a otros microorganismos.

Guggenbichler y cols.²⁰⁶ informaron de 30 niños con osteomielitis aguda hematógena tratados satisfactoriamente (29 curaciones) con fosfomicina y otros antimicrobianos en combinación. Del total de casos, no se aisló el microorganismo causal en el 43'4%, y en un 40% el aislamiento correspondió a *S. aureus*.

Roth y cols.²⁰⁸, Potel y cols.²⁰⁹, Guerrero²⁵ y Meißner y cols.²¹⁰, trataron también infecciones osteoarticulares de diferentes etiologías con fosfomicina sola o en combinación. Obtuvieron un 78%,

54%, 85% y 73'5% de curaciones, respectivamente. Los aislamientos estafilocócicos respecto al total de microorganismos encontrados, correspondieron al 31'5%, 92'3%, 74% y 61%, respectivamente. En general los efectos secundarios fueron escasos y poco importantes. Sólo en uno de estos trabajos²⁰⁸ se incluyó una serie importante de agentes Gram negativos, obteniendo resultados tan buenos o incluso mejores que los demás autores.

En resumen, se puede afirmar que fosfomicina ha resultado eficaz en el tratamiento de osteomielitis, especialmente frente a estafilococos, aunque se ha utilizado relativamente poco, sobre todo en lo que se refiere a los Gram negativos.

DOSIS	FOSFOMICINA CALCICA	FOSFOMICINA TROMETAMOL
0'5 g.	3'8 (a las 2 h.)	4'1 (a las 2-3 h.)
1 g.	5'2 (a las 2 h.)	10'9 (a las 2-3 h.)
2 g.	7'1 (a las 4 h.)	20'9 (a las 2-3 h.)
3 g.		33'1 (a las 2-3 h.)

Tabla 1.3.I: Concentración sérica máxima (mcg./ml.) tras una sola dosis oral de fosfomicina²¹.

DOSIS	INTRAMUSCULAR	INTRAVENOSA
0'25 g.	8'7	12'6 a 18
0'5 g.	17'1	31'5
1 g.	28'4	44'4 a 58'6
2 g.	45'5	78'4 a 93'2

Tabla 1.3.II: Concentración sérica máxima (mcg./ml.) tras una sola dosis parenteral de fosfomicina²¹.

2.- OBJETIVOS

1.- Desarrollar un modelo experimental de osteomielitis crónica en la rata, por *Pseudomonas aeruginosa*, comprobando su validez mediante estudios microbiológicos e histopatológicos.

2.- Estudiar la eficacia terapéutica de fosfomicina en el modelo desarrollado.

3.- Comparar la eficacia terapéutica de pautas cortas y largas de tratamiento (14 y 28 días respectivamente).

4.- Estudiar las concentraciones óseas de fosfomicina en el modelo desarrollado, tanto en hueso sano como enfermo.

5.- Estudiar la farmacocinética sérica de fosfomicina en la rata, objeto del modelo experimental.

3.- MATERIAL Y METODOS

3.1.- MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOMIELITIS POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA

3.1.1.- MATERIAL

ANIMAL DE EXPERIMENTACION

Un lote de 30 ratas "Wistar" adultas, machos, subdividido en cuatro grupos de 7-8 animales. Un lote accesorio de 16 ratas similares, subdividido en dos grupos de 8 animales.

Ambos lotes homogéneos en edad y peso, con un peso medio de 350 g.

MICROORGANISMO

Pseudomonas aeruginosa obtenida de un aislamiento clínico del Hospital Militar Central Gómez Ulla (Madrid). HGU-2.

Inóculo: 10^8 ufc./0'05 ml., calculado según la escala de MacFarland.

SUBSTANCIA ESCLEROSANTE

Sulfato de bario estéril, diluido al 10% en suero fisiológico (Solución de cloruro sódico al 0'9%).

MEDICACION ANESTESICA

- Preanestesia: Clorpromacina (Largactil[®], Rhone-Poulenc).
- Anestesia: Tiopental sódico (Pentotal sódico[®], Abbot).
Eter anestésico (éter etílico).
- Material de administración de medicación habitual.

- Campana de éter.

MATERIAL DE PREPARACION DE CAMPO QUIRURGICO

- Máquina de afeitar: “Professional Animal Grooming Model A-5 with detachable blade feature. Oster Divission of Sunbeam Corp. Milwaukee, Wisconsin”.

- Alcohol de 70°.
- Material habitual para limpieza de campo quirúrgico.

MATERIAL DE CIRUGIA (Fig. 3.1.I)

- Material habitual para mantener condiciones estériles: guantes, mascarillas, batas, paños, apósitos, etc.

- Material quirúrgico habitual: pinzas, tijeras, etc.
- Bisturí y hojas desechables: “Sterilklinge BB-511” y “BB-522”.
- Bisturí desechable: “Sabre sterile single use scalpels shape 20”.
- Seda de sutura del nº 0, 1 ó 2, con agujas desechables.
- Cera estéril ósea.
- Micromotor: “Max Delux Universal AC/DC”. Adaptador “MM-210”.
- “Drill”. Mini-Perceuse Maxicraft “T/M” max: 14.500. “Maxiserrage”: 2’5 mm.
- Fresas “Maxicraft”. Fresas de acero redondas de 1 mm. de diámetro.

MATERIAL DE SACRIFICIO Y OBTENCION Y PREPARACION DE MUESTRAS

- Tiopental sódico (Pentotal sódico[®], Abbot).

- Material quirúrgico habitual.
- Material de laboratorio habitual (Recogida de muestras).
- Mortero de acero inoxidable (Triturado óseo).
- Caldo de Müller-Hinton.
- Formaldehído al 10%.

3.1.2.- METODO

ANIMALES

Para inoculación de *Pseudomonas aeruginosa* se utiliza sólo el lote de 30 ratas.

MICROORGANISMO

El bacilo se mantiene en incubación la noche anterior al día de la inoculación en estufa a 37°C, en agar Müller-Hinton. Se prepara el inóculo el mismo día de su utilización, comparando la densidad óptica con la escala de MacFarland, para obtener una concentración bacteriana aproximada de 10⁸ ufc./0'05 ml.

PREANESTESIA Y ANESTESIA (Figs. 3.1.II y 3.1.III)

- Preanestesia: Se administra a los animales 30 minutos antes de la anestesia, clorpromacina vía intramuscular. Dosis: 0'7-0'9 cc. (3'5-4'5 mg.)

- Anestesia: La anestesia se realiza con tiopental sódico vía intraperitoneal; dosis: 50 mg./kg. de peso. Para su administración se prepara una dilución 1/60 de un vial de 1 cc., conteniendo 1 g. de tiopental sódico, con agua destilada; la nueva preparación contiene 16'6 mg./cc. Si

no fuese suficiente la anestesia con tiopental sódico, se administra por inhalación éter etílico, mediante campana de plástico que contiene algodones empapados en esta sustancia, aproximándose a la cabeza del animal, para facilitar su respiración.

TECNICA DE INOCULACION (Figs. 3.1.IV, 3.1.V, 3.1.VI y 3.1.VII)

Se afeita la pata trasera izquierda y se limpia con alcohol de 70°. A continuación se coloca el animal en un campo quirúrgico estéril. La técnica quirúrgica debe hacerse con la máxima asepsia. Se practica una incisión longitudinal medial, en bloque, en el tercio superior de la tibia (tuberosidad), hasta la cresta tibial, rechazando planos musculares, aponeurosis y periostio. Se taladra en la cara interna metafisiaria con un microtaladro (“drill”), con broca de 1 mm., atravesando la cortical ósea y alcanzando la cavidad medular. Tras retirar la broca, se inserta en el canal así provocado una aguja de 0’8 mm. hasta la cavidad medular. Se inyectan 0’05 cc. de la solución de sulfato de bario estéril al 10% como agente esclerosante y, a continuación y sin retirar la aguja, 0’05 cc. de la suspensión bacteriana. Una vez inyectado el inóculo, se administra por la misma aguja 0’05 cc de solución salina estéril, para garantizar la entrada de los anteriores elementos. Posteriormente se retira la aguja, se obtura la cavidad con cera estéril para prevenir el “desbordamiento” del material introducido, y se cierra la herida en un solo plano con seda. El animal se devuelve a su jaula.

OBTENCION Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

A los 7, 14, 28 y 56 días tras la inoculación, se sacrifica un grupo de ratas, utilizando una sobredosis de tiopental sódico

intraperitoneal. Se desarticulan y aíslan las tibias inoculadas, y se lavan externamente con alcohol de 70°. Un tercio de las muestras se introducen en recipientes individuales con formaldehído al 10% para su procesamiento histopatológico. El resto de las tibias, tras ser pesadas, se trituran en mortero estéril de acero inoxidable y se introducen en recipientes individuales que contienen 5 ml. de caldo de Müller-Hinton, para su transporte a 4°C y posterior estudio microbiológico.

- Procesamiento histopatológico: Las muestras obtenidas, previamente fijadas en formaldehído al 10%, son decalcificadas con ácido nítrico al 7%. Posteriormente se procesan según método habitual de inclusión en parafina (paraplast). Se realizan diversas tinciones: hematoxilina-eosina, reticulina de Wilder, PAS y tricrómico de Masson.

- Procesamiento microbiológico: A partir de la solución de tibias trituradas se realizan diluciones seriadas en suero fisiológico. Se toman 0'025 ml. de la solución original y de cada una de las diluciones con micropipeta, y se siembra en placas de Petri con agar Müller-Hinton. Se incuban las placas durante 24 horas, a 37°C en estufa de cultivo. Finalmente se procede a la lectura de las placas con recuento de colonias y a la identificación del microorganismo por técnicas habituales.

LOTES ACCESORIOS

En un grupo accesorio de 8 ratas, se provocan lesiones por el microtaladro, sin inoculación alguna, sacrificándose en grupos de dos para estudio histopatológico, a las 24 horas y a los 3, 7 y 14 días.

En el otro grupo accesorio, asimismo de 8 animales, se provocan lesiones por el microtaladro y se inyecta la substancia esclerosante (sulfato

de bario estéril al 10% en suero fisiológico), sacrificándose en grupos de dos para estudio histopatológico, a las 24 horas y a los 3, 7 y 14 días.

ANALISIS ESTADISTICO

Se utiliza el programa de ordenador estándar Statview[®], versión 4.0, para Macintosh.

Los datos cuantitativos se presentan, además de individualmente, en forma de media aritmética \pm error estándar de la media, para cada grupo de animales.

Para el estudio de los datos cuantitativos, se realiza análisis de la varianza utilizando la prueba de la F de Snédecor, para valorar la homogeneidad o heterogeneidad de las muestras. Posteriormente, si se comprueba la heterogeneidad de la muestra global, se comparan los grupos dos a dos, a través de sus medias, utilizando la prueba de la t de Student para muestras no pareadas.

Se calcula el coeficiente de variación de cada grupo de la muestra total. Si éste supera el 33'3%, indica que existe una alta dispersión. En este caso, y por tratarse de muestras pequeñas, se considera necesario corroborar los resultados estadísticos mediante pruebas no paramétricas²¹¹: Se aplica el test de Kruskal-Wallis para valorar la homogeneidad o heterogeneidad de las muestras, y el test de la U de Mann-Whitney para comparar los grupos dos a dos.

En todos los casos, se considera que los resultados son estadísticamente significativos cuando la probabilidad de que las diferencias encontradas se deban al azar es menor del 5% ($p < 0'05$)²¹¹.



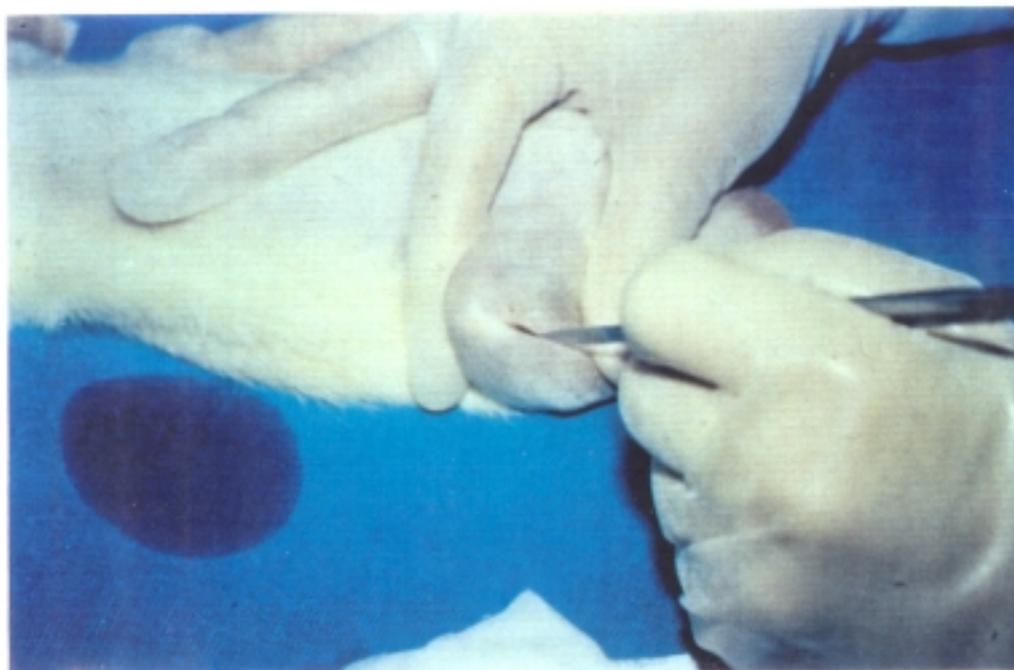
**Fig. 3.1.I: Modelo experimental de osteomielitis.
Material de cirugía.**



**Fig. 3.1.II: Modelo experimental de osteomielitis.
Anestesia con tiopental sódico.**



**Fig. 3.1.III: Modelo experimental de osteomielitis.
Anestesia con éter etílico.**



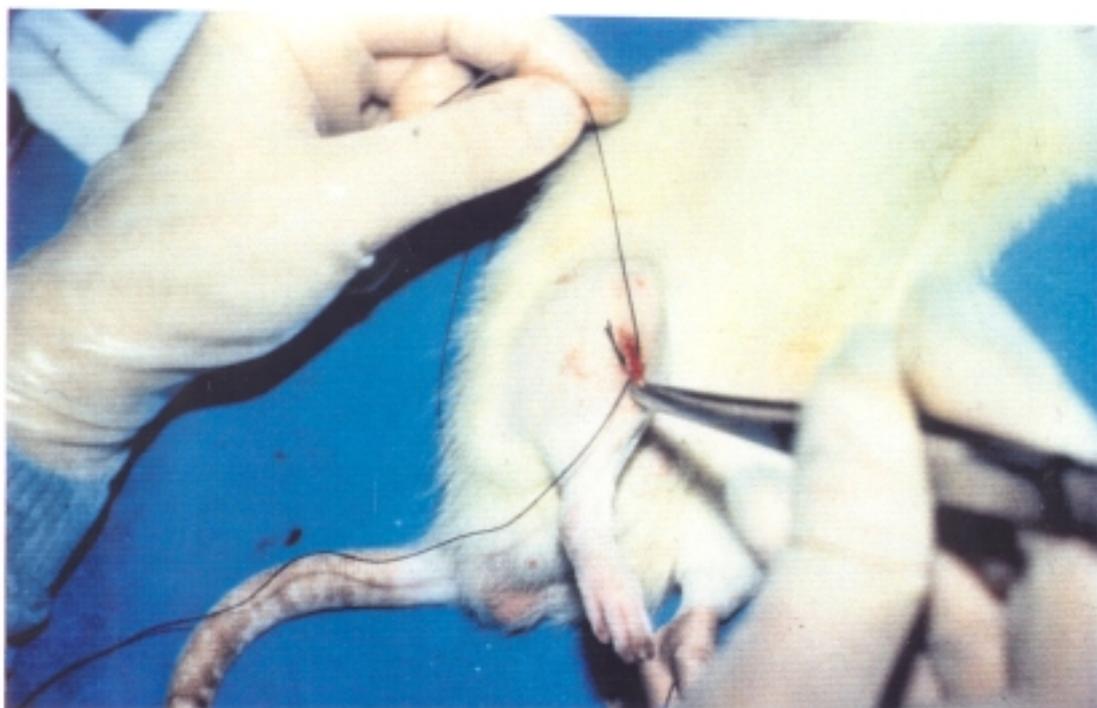
**Fig. 3.1.IV: Modelo experimental de osteomielitis.
Incisión longitudinal en bloque.**



**Fig. 3.1.V: Modelo experimental de osteomielitis.
Taladro de la cara interna de la metáfisis tibial.**



**Fig. 3.1.VI: Modelo experimental de osteomielitis.
Inoculación.**



**Fig. 3.1.VII: Modelo experimental de osteomielitis.
Cierre de la herida en un solo plano.**

3.2.- MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOMIELITIS POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA. TRATAMIENTO CON FOSFOMICINA

3.2.1.- MATERIAL

ANIMAL DE EXPERIMENTACION

Un lote de 40 ratas "Wistar" adultas, hembras, subdividido en tres grupos. El lote es homogéneo en edad y peso, con un peso medio de 275 g.

MICROORGANISMO

Pseudomonas aeruginosa obtenida de un aislamiento clínico óseo del Hospital Militar Central Gómez Ulla (Madrid). HGU-1.

La cepa es sensible a ceftazidima, piperacilina, imipenem, ciprofloxacino, gentamicina, amikacina y fosfomicina; resistente a cefalotina, cefotaxima y ampicilina. CMI de fosfomicina: 8 mcg./ml.

Inóculo: 10^8 ufc/0'05 ml., calculado según la escala de MacFarland.

ANTIMICROBIANO

Fosfomicina (Fosfocina[®], CEPA).

RESTO DE MATERIAL

El referido en el modelo experimental de osteomielitis (Punto 3.1.1).

3.2.2.- METODO

CREACION DE OSTEOMIELITIS

Método descrito anteriormente (Punto 3.1.2).

DETERMINACION DE LAS CMI_s

Se realizaron, previa y posteriormente al tratamiento antibiótico, por los métodos habituales empleados en nuestro departamento.

TRATAMIENTO

Se establecen tres grupos de animales:

- Grupo 1: Control, sin tratamiento. 12 ratas.

Los animales se sacrifican 15 días después de provocar la infección.

- Grupo 2: Tratamiento corto. 14 ratas.

Se inicia el tratamiento a los 14 días de provocar la infección y se mantiene durante 14 días.

Los animales se sacrifican 28 días después de finalizar el tratamiento (56 días después de la inoculación).

- Grupo 3: Tratamiento largo. 14 ratas.

Se inicia el tratamiento a los 14 días de provocar la infección y se mantiene durante 28 días.

Los animales se sacrifican 28 días después de finalizar el tratamiento (70 días después de la inoculación).

DOSIS DE ANTIMICROBIANO

La dosis de fosfomicina fue de 200 mg./12 h. , administrada por vía subcutánea.

Se calcula a partir de una dosis estándar en osteomielitis humana del adulto, establecida en mg./kg. de peso/día. Esta cantidad se corrige multiplicando por 6 (factor de corrección peso/superficie)^{212,213}. Así se obtiene la dosis en mg./kg. de peso/día en la rata.

OBTENCION Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

El sacrificio de los animales se realiza administrando una sobredosis de tiopental sódico intraperitoneal, diluído al 1/60 (16'6 mg./cc.). Se desarticulan y aíslan las tibias inoculadas, y se lavan externamente con alcohol de 70°. Las muestras destinadas a estudio histopatológico, cuatro de cada grupo, se fijan con formaldehído al 10%. El resto de las tibias se pesan y posteriormente se pulverizan en mortero estéril de acero inoxidable, diluyendo el triturado en 5 cc. de caldo Müller-Hinton, para su procesamiento microbiológico.

- Procesamiento histopatológico: Las muestras obtenidas, previamente fijadas en formaldehído al 10%, son decalcificadas con ácido nítrico al 7%. Posteriormente se procesan según método habitual de inclusión en parafina (paraplast). Se realizan diversas tinciones: hematoxilina-eosina, reticulina de Wilder, PAS y tricrómico de Masson.

- Procesamiento microbiológico: A partir de la solución de tibias trituradas se realizan diluciones seriadas en suero fisiológico. Se toman 0'025 ml. de la solución original y de cada una de las diluciones con micropipeta, y se siembra en placas de Petri con agar Müller-Hinton. Se incuban las placas durante 24 horas, a 37°C en estufa de cultivo. Finalmente se procede a la lectura de las placas con recuento de colonias y a la identificación del microorganismo por técnicas habituales.

ANALISIS ESTADISTICO

Se utiliza el programa de ordenador estándar Statview[®], versión 4.0, para Macintosh.

Los datos cuantitativos se presentan, además de individualmente, en forma de media aritmética \pm error estándar de la media, para cada grupo de animales.

Para el estudio de los datos cuantitativos, se realiza análisis de la varianza utilizando la prueba de la F de Snédecor, para valorar la homogeneidad o heterogeneidad de las muestras. Posteriormente, si se comprueba la heterogeneidad de la muestra global, se comparan los grupos dos a dos, a través de sus medias, utilizando la prueba de la t de Student para muestras no pareadas.

Se calcula el coeficiente de variación de cada grupo de la muestra total. Si éste supera el 33'3%, indica que existe una alta dispersión. En este caso, y por tratarse de muestras pequeñas, se considera necesario corroborar los resultados estadísticos mediante pruebas no paramétricas²¹¹. Se aplica el test de Kruskal-Wallis para valorar la homogeneidad o heterogeneidad de las muestras, y el test de la U de Mann-Whitney para comparar los grupos dos a dos.

En todos los casos, se considera que los resultados son estadísticamente significativos cuando la probabilidad de que las diferencias encontradas se deban al azar es menor del 5% ($p < 0'05$)²¹¹.

3.3.- MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOMIELITIS POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA. NIVELES OSEOS DE FOSFOMICINA

3.3.1.- MATERIAL

ANIMAL DE EXPERIMENTACION

Un lote de 8 ratas “Wistar” adultas, machos, subdividido en dos grupos. El lote es homogéneo en edad y peso, con un peso medio de 350 g.

MICROORGANISMO

Pseudomonas aeruginosa obtenida de un aislamiento clínico del Hospital Militar Central Gómez Ulla (Madrid). HGU-1.

ANTIMICROBIANO

Fosfomicina (Fosfocina[®], CEPA).

MATERIAL PARA LA PREPARACION DE MUESTRAS

- Nieve carbónica.
- Congelador convencional con capacidad para -20°C.
- Centrífuga: “IEC CENTRA-7R Refrigerated Centrifuge. Máx.: 6.000 rpm.”
- Solución amortiguadora: THAM (Buffer TRIS) pH 8, 0’05 M, cuya composición es:
 - Trishidroximetil-aminometano, 6’052 g.
 - Agua, csp. 1 l.
 - Acido clorhídrico csp. ajustar el pH a 8.

RESTO DE MATERIAL

El referido en el modelo experimental de osteomielitis (Punto 3.1.1).

3.3.2.- *METODO*

CREACION DE OSTEOMIELITIS

Método descrito anteriormente (Punto 3.1.2).

TRATAMIENTO

Se establecen dos grupos de animales:

- Grupo A: Tratamiento iniciado a los 14 días de provocar la infección, mantenido durante 7 días.

Los animales se sacrifican 5 minutos antes de la última dosis (4 ratas).

- Grupo B: Tratamiento iniciado a los 14 días de provocar la infección, mantenido durante 7 días.

Los animales se sacrifican 1 h. después de la última dosis (4 ratas).

DOSIS DE ANTIMICROBIANO

La dosis de fosfomicina fue de 200 mg./12 h., administrada por vía subcutánea.

OBTENCION Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

El sacrificio de los animales se realiza administrando una sobredosis de tiopental sódico intraperitoneal, diluido al 1/60 (16'6

mg./cc.). Se desarticulan y aíslan ambas tibias, para medir las concentraciones de antimicrobiano en hueso sano e infectado (subgrupos 1 y 2, respectivamente, para cada grupo de animales), y se lavan externamente con alcohol de 70°. Las muestras se congelan a -20°C y se trituran en mortero estéril de acero inoxidable, introducido en nieve carbónica para facilitar la pulverización del hueso. Posteriormente se pesa el triturado y se diluye en la solución amortiguadora. Para calcular la cantidad de solución amortiguadora (en ml.) necesaria, se multiplica el peso (en g.) por 4. La mezcla se agita en baño frío durante 2 h., al cabo de las cuales se centrifuga (también en frío) durante 15 minutos aproximadamente a 2.500 rpm. Se valora el sobrenadante, estudiando la concentración de fosfomicina por el método microbiológico de difusión en agar, descrito y utilizado por otros autores^{26,214,215}, utilizando como cepa de ensayo *Proteus vulgaris* ATCC-21200.

ANALISIS ESTADISTICO

Se utiliza el programa de ordenador estándar Statview[®], versión 4.0, para Macintosh.

Los datos cuantitativos se presentan, además de individualmente, en forma de media aritmética \pm error estándar de la media, para cada grupo de muestras.

Se comparan las muestras, a través de sus medias, mediante la prueba de la t de Student.

Se calcula el coeficiente de variación de cada muestra. Si éste supera el 33'3%, indica que existe una alta dispersión. En este caso, y por tratarse de muestras pequeñas, se considera necesario corroborar los

resultados estadísticos mediante pruebas no paramétricas²¹¹, aplicando el test de la U de Mann-Whitney.

En todos los casos, se considera que los resultados son estadísticamente significativos cuando la probabilidad de que las diferencias encontradas se deban al azar es menor del 5% ($p < 0'05$)²¹¹.

3.4.- NIVELES SERICOS DE FOSFOMICINA EN RATAS “WISTAR”

3.4.1.- MATERIAL

ANIMAL DE EXPERIMENTACION

Un lote de 6 ratas “Wistar” adultas, machos, sanas. El lote es homogéneo en edad y peso, con un peso medio de 350 g.

ANTIMICROBIANO

Fosfomicina (Fosfocina[®], CEPA).

MEDICACION ANESTESICA

- Anestesia: - Tiopental sódico (Pentotal sódico[®], Abbot).
- Eter anestésico (éter etílico).
- Material de administración de medicación habitual.
- Campana de éter.

MATERIAL PARA OBTENCION DE MUESTRAS

- Material habitual para extracciones sanguíneas.
- Tubos de ensayo convencionales.

3.4.2.- METODO

DOSIS DE ANTIMICROBIANO

Se administran 200 mg. subcutáneos a cada uno de los animales.

OBTENCION Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Las muestras se obtienen por punción intracardiaca.

Previamente a la misma se procede a anestésiar al animal con tiopental sódico vía intraperitoneal; dosis: 50 mg./kg de peso. Para su administración se prepara una dilución 1/60 de un vial de 1 cc., conteniendo 1 g. de tiopental sódico, con agua destilada; la nueva preparación contiene 16'6 mg./cc. Si no fuese suficiente la anestesia con tiopental sódico, se administra por inhalación éter etílico, mediante campana de plástico que contiene algodones empapados en esta substancia, aproximándose a la cabeza del animal. Para las ultimas tomas de muestras, se precisa una nueva dosis de anestesia intraperitoneal.

Se realizan extracciones 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas y 10 horas después de administrar el antibiótico, obteniéndose 1 cc. en cada extracción.

La concentración de fosfomicina en las muestras obtenidas se valora por el método microbiológico de difusión en agar, descrito y utilizado por otros autores^{26,214,215}, utilizando como cepa de ensayo *Proteus vulgaris* ATCC-21200.

CALCULO DE LAS CONSTANTES FARMACOCINETICAS Y ANALISIS MATEMATICO DE LA CINETICA DE ELIMINACION

Se utiliza el programa de ordenador estándar Statview[®], versión 4.0, para Macintosh.

Los datos cuantitativos se presentan, además de individualmente, en forma de media aritmética \pm error estándar de la media, para cada grupo de muestras.

A partir de los valores medios obtenidos para cada unidad de tiempo, se obtiene una curva de concentración de fosfomicina (C) en función del tiempo (curva de absorción-eliminación).

A partir de esta curva, se hallan la concentración máxima del antibiótico ($C_{m\acute{a}x}$), el tiempo en que se alcanza dicha concentración ($T_{m\acute{a}x}$), el área bajo la curva desde tiempo 0 a 10 horas (ABC_0^{10}), el área bajo la curva desde tiempo 0 a infinito (ABC_0^{∞}), la hemivida ($T_{1/2}$) y la constante de eliminación (K_e), factor que rige la desaparición del antibiótico del suero, que se expresa en h^{-1} .

El tramo descendente de la curva representa la cinética de eliminación, que tiende a ajustarse a una curva exponencial, cuya fórmula se obtiene. Esta puede hacerse lineal si los datos se representan en forma de logaritmo de la concentración²¹⁶, lo cual nos permite realizar el análisis matemático de la cinética del antibiótico. El ajuste de la recta así obtenida—recta de regresión que relaciona concentraciones del fármaco, expresadas en forma logarítmica, con el tiempo—corresponde a la ecuación²¹⁶:

$$\text{Log } C = [-(K_e / 2.303) \times t] + \log C_0$$

en la cual C es la concentración de fosfomicina en tiempo t, C_0 es la concentración en tiempo 0 y $\log C_0$ es la intersección con la ordenada, mientras que $-(K_e / 2.303)$ es el coeficiente angular.

Para valorar la bondad del ajuste de la recta de regresión obtenida matemáticamente, se calculan el coeficiente de correlación (R), el coeficiente de determinación (R^2) y la seguridad de la regresión (p).

K_e se puede calcular²¹⁶ a partir de la pendiente de la recta que mejor se ajuste a los valores de $\log C$ en función del tiempo, o bien, despejando de la ecuación de la recta semilogarítmica de regresión, a partir de:

$$K_e = (2.303 / t) \times \log (C_0 / C)$$

La hemivida, definida como el tiempo necesario para que la concentración del antibiótico en suero se reduzca a la mitad, se puede calcular, conociendo la K_e , mediante la siguiente relación:

$$T_{1/2} = 0.693 / K_e$$

Esta relación se deduce de la ecuación de la recta de regresión en la cual, despejando t , se obtiene:

$$t = (2.303 / K_e) \times \log (C_0 / C)$$

En este caso, y puesto que se trata de hemivida, C_0 es por definición el doble de C , y por tanto

$$T_{1/2} = (2.303 / K_e) \times \log (2C / C)$$

o sea

$$T_{1/2} = (2.303 / K_e) \times \log 2$$

es decir

$$T_{1/2} = 0.693 / K_e$$

Se calculó el área bajo la curva desde el tiempo 0 hasta el último determinado en la curva de niveles (10 horas), con un minicomputador Hewlett-Packard 97, aplicando la regla de Foster y Bourne²¹⁷. Para calcular el área desde el último punto experimentado hasta el infinito, se aplicó la ley de Dost²¹⁸, que consiste en dividir la concentración existente en el último punto experimentado por la K_e . La suma de ambas áreas nos da el área bajo la curva desde 0 a infinito.

4.- RESULTADOS

4.1.- MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOMIELITIS POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA

4.1.1.- MORTALIDAD

El 20% de los animales (6 ratas) murieron espontáneamente en las primeras 48 horas tras la inoculación de *Pseudomonas aeruginosa*. Las 24 ratas que sobrevivieron, quedaron divididas en 4 grupos de 6 animales cada uno.

La causa de la muerte no se determinó, atribuyéndose a efectos de la anestesia o a septicemia por *P. aeruginosa*.

4.1.2.- RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

Se realizó estudio microbiológico en 4 ratas de cada grupo (Tabla 4.1.I y Fig. 4.1.I). Los resultados fueron suficientemente homogéneos para cada grupo de animales, con un coeficiente de variación menor del 33% en todos los casos, por lo que no fue necesario aplicar pruebas no paramétricas para el análisis estadístico.

El análisis de la varianza resultó altamente significativo para la existencia de heterogeneidad de las muestras ($p < 0'0001$).

Se comprobó un aumento significativo en el número de unidades formadoras de colonias por gramo de hueso, entre los grupos de 7 y 14 días postinoculación ($p = 0'0089$) y entre los de 28 y 56 días ($p = 0'0122$), comprobándose así la progresión de la enfermedad a lo largo del tiempo.

4.1.3.- RESULTADOS HISTOPATOLOGICOS

Se realizó estudio histopatológico en 2 ratas de cada grupo (Tabla 4.1.II; Figs. 4.1.II y 4.1.III), desmostrándose la aparición de lesiones osteomielíticas evidentes. Se objetivaron nidos osteomielíticos a partir del día 14. Las necrosis óseas estaban rodeadas e infiltradas por polimorfonucleares y células plasmáticas; más hacia la periferia , a partir del día 28, se observaban osteocitos y aposición de hueso, tendiendo hacia la formación de lesión granulomatosa de cuerpo extraño. Macroscópicamente, se observó osteolisis y deformación.

En el grupo accesorio en el que se habían provocado tan sólo lesiones por el taladro, se encontraron lesiones localizadas, sin secuestros, con escasa reacción leucocitaria y fibrosa y sin activación osteoblástica marcada.

En el otro grupo accesorio de animales en el que además se había inoculado el agente esclerosante, se encontraron lesiones esclerosas medulares y destructivas trabeculares, sin reacción osteoblástica ni fibrosa.

Días tras inoculación	Número de animal	ufc./g. de hueso
7	1	2'400 x 10 ⁷
7	2	3'160 x 10 ⁷
7	3	4'360 x 10 ⁷
7	4	5'200 x 10 ⁷
14	1	6'320 x 10 ⁷
14	2	1'000 x 10 ⁸
14	3	6'840 x 10 ⁷
14	4	1'024 x 10 ⁸
28	1	0'920 x 10 ⁸
28	2	1'112 x 10 ⁸
28	3	1'000 x 10 ⁸
28	4	1'200 x 10 ⁸
56	1	1'400 x 10 ⁸
56	2	1'396 x 10 ⁸
56	3	2'000 x 10 ⁸
56	4	1'632 x 10 ⁸

Días tras inoculación	Número de animales	m _x ufc./g. ± S _m	cv
7	4	3'780 x 10 ⁷ ± 0'622 x 10 ⁷	32'9%
14	4	8'350 x 10 ⁷ ± 1'029 x 10 ⁷	24'6%
28	4	1'058 x 10 ⁸ ± 0'062 x 10 ⁸	11'6%
56	4	1'607 x 10 ⁸ ± 0'142 x 10 ⁸	17'7%

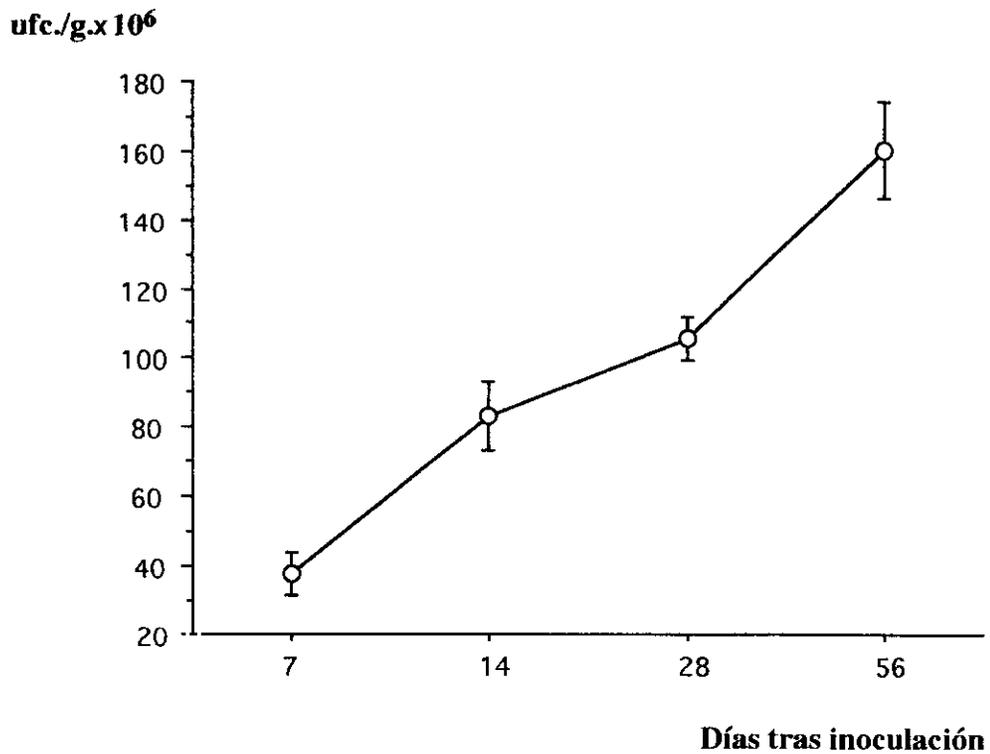
Entre 7 y 14 días: p = 0'0089

Entre 14 y 28 días: p > 0'05

Entre 28 y 56 días: p = 0'0122

Tabla 4.1.I: Modelo experimental de osteomielitis por *P. aeruginosa*.

Resultados microbiológicos.



Entre 7 y 14 días: $p = 0'0089$

Entre 14 y 28 días: $p > 0'05$

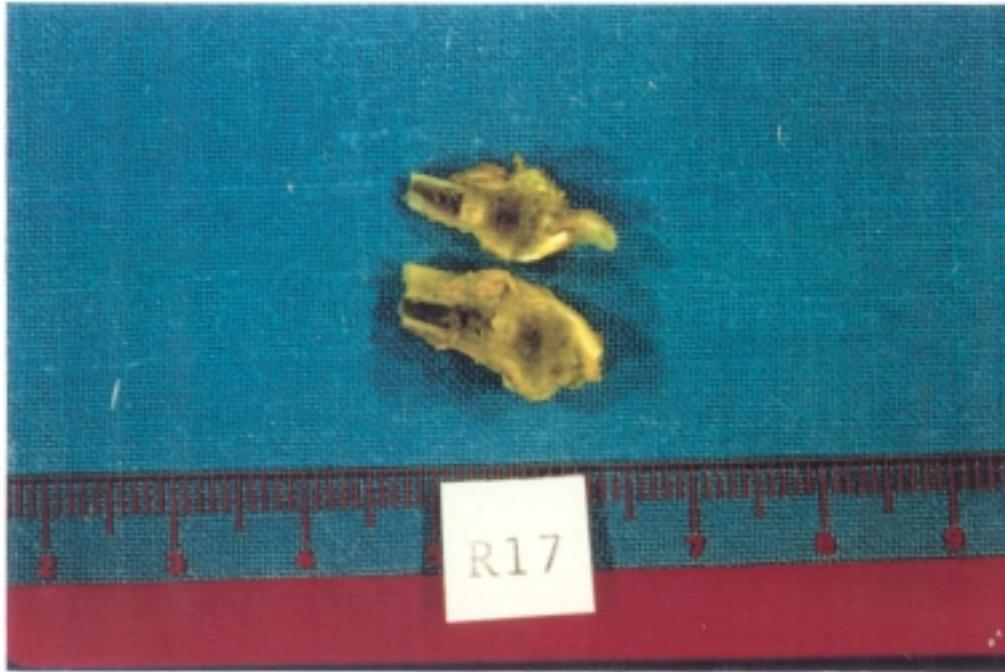
Entre 28 y 56 días: $p = 0'0122$

**Fig. 4.1.I: Modelo experimental de osteomielitis por *P. aeruginosa*.
Resultados microbiológicos ($m_x \pm S_m$).**

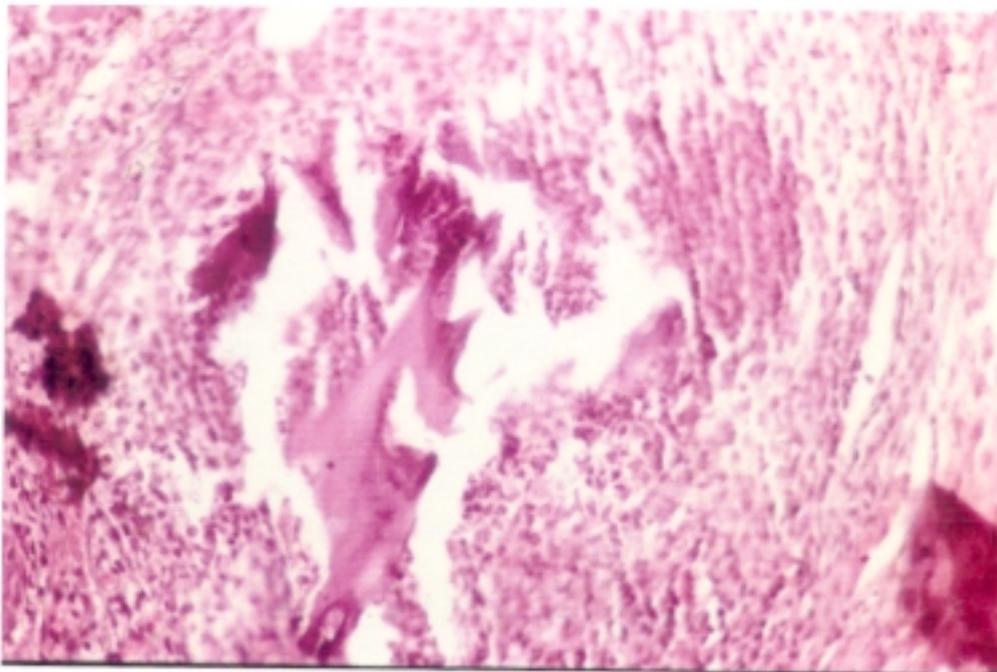
DIAS TRAS INOCULACION	LESION MACROSCOPICA	LESION MICROSCOPICA
7	Sin alteraciones	Sin alteraciones
14	Lesión osteolítica Deformación ósea	Necrosis supurativa ósea
28	Lesión osteolítica Deformación ósea	Necrosis supurativa con sequestróseos
56	Lesión esclerosa Deformación ósea	Lesión crónica esclerosa Lesión granulomatosa de cuerpo extraño

Tabla 4.1.II: Modelo experimental de osteomielitis por *Pseudomonas aeruginosa*.

Resultados histopatológicos.



**Fig. 4.1.II: Modelo experimental de osteomielitis.
Deformidad ósea.**



**Fig. 4.1.III: Modelo experimental de osteomielitis.
“Nidus” osteomielítico.**

4.2.- MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOMIELITIS POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA. TRATAMIENTO CON FOSFOMICINA

4.2.1.- MORTALIDAD Y EFECTOS SECUNDARIOS

Se inocularon 40 animales, de los que 6 (15%) murieron antes de la fecha del sacrificio, en la primeras 48 horas tras la inoculación. Las 34 ratas que sobrevivieron, quedaron distribuidas en 3 grupos de animales: 10 para el grupo 1 (control) y 12 para cada uno de los grupos de tratamiento (grupos 2 y 3).

La causa de la muerte no se determinó, atribuyéndose a efectos de la anestesia o a sepsis por *P. aeruginosa*.

Ni durante el período de tratamiento ni durante el seguimiento posterior pudieron objetivarse efectos secundarios graves; sí presentaron lesiones nodulares subcutáneas en el punto de inyección, que desaparecieron antes de ser sacrificados los animales.

4.2.2.- RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

Se realizó estudio microbiológico en 6 ratas del grupo 1 (control sin tratamiento) y en 8 ratas de los grupos 2 y 3 (tratamiento durante 14 y 28 días respectivamente) (Tablas 4.2.Ia y 4.2.Ib; Fig. 4.2.I).

El coeficiente de variación superó el 33% en todos los grupos, por lo que la prueba de la t de Student se complementó con pruebas no

paramétricas para el análisis estadístico. El análisis de la varianza (F de Snédecor), demostró heterogeneidad de las muestras con una significación del 99'98% ($p = 0'0002$). El test no paramétrico de Kruskal-Wallis demostró así mismo heterogeneidad de las muestras con una significación del 99'87% ($p = 0'0013$).

GRUPO 1

En todas las muestras óseas estudiadas en el grupo control sin tratamiento, se recuperó el microorganismo.

GRUPO 2

En los animales tratados durante 14 días, se obtuvo esterilización en el 50% de los casos. En los que no se logró la esterilización, se observó una discreta disminución del número de ufc./g. de hueso, respecto al grupo control. Al comparar las medias de unidades formadoras de colonias de este grupo con respecto a los animales no tratados, se comprobó una significación del 99'74% ($p = 0'0026$) para el test de la t de Student. Con el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney, la significación fue también elevada (99'81%; $p = 0'0019$).

GRUPO 3

En los animales tratados durante 28 días, la esterilización alcanzó el 75% de los casos. En los dos animales en los que se recuperó el microorganismo, el número de ufc./g. fue inferior al de los otros dos grupos. La significación respecto al grupo control fue del 99'75% ($p = 0'0025$) para el test de la t de Student. Con el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney, la significación fue del 99'81% ($p = 0'0019$).

Comparando ambos grupos de tratamiento, no se observaron diferencias estadísticamente significativas con ninguna de las dos pruebas utilizadas ($p > 0'05$).

CMI's

La CMI de fosfomicina frente a la cepa de *P. aeruginosa* inoculada, previamente al tratamiento, fue 8 mcg./ml. Las CMI's de los microorganismos aislados en las tibias de los animales tratados no se diferenciaron respecto al original, oscilando entre 8 y 16 mcg./ml.

4.2.3.- RESULTADOS HISTOPATOLOGICOS

Se realizó estudio histopatológico en 4 ratas de cada grupo (Tabla 4.2.II; Figs. 4.2.II y 4.2.III).

LESIONES MACROSCOPICAS

En el grupo control se observó lesión osteolítica en el 100% de los casos. Esta misma aparecía sólo en el 50% de los animales tratados 14 días y en el 25% de los tratados 28 días; en el 50 y 75% restantes, respectivamente, no se hallaron alteraciones.

LESIONES MICROSCOPICAS

En los controles se observó necrosis destructiva supurada en el 100% de las muestras. En el grupo 2 se apreció esta misma lesión en el 50% de los casos, mientras que en el resto no se objetivaron lesiones óseas de actividad osteomielítica. En el grupo 3 existía un "nidus" en fase de

regresión en el 25% de los animales, y en el resto no había alteración alguna.

En los animales tratados disminuyó el grado de lesión ósea respecto al control. También se observaron diferencias en el examen histopatológico entre ambos grupos de tratamiento.

Grupo de tratamiento	Número de animal	ufc./g. de hueso
1	1	1'040 x 10 ⁷
1	2	2'000 x 10 ⁸
1	3	4'200 x 10 ⁷
1	4	1'840 x 10 ⁸
1	5	6'120 x 10 ⁷
1	6	2'000 x 10 ⁸
2	1	5'160 x 10 ⁵
2	2	0'000
2	3	2'000 x 10 ⁶
2	4	0'000
2	5	4'000 x 10 ⁶
2	6	0'000
2	7	0'000
2	8	1'200 x 10 ⁶
3	1	0'000
3	2	0'000
3	3	0'000
3	4	8'000 x 10 ⁵
3	5	0'000
3	6	4'000 x 10 ⁵
3	7	0'000
3	8	0'000

**Tabla 4.2.Ia: Modelo experimental de osteomielitis por *P. aeruginosa*:
Tratamiento con fosfomicina.
Resultados microbiológicos.**

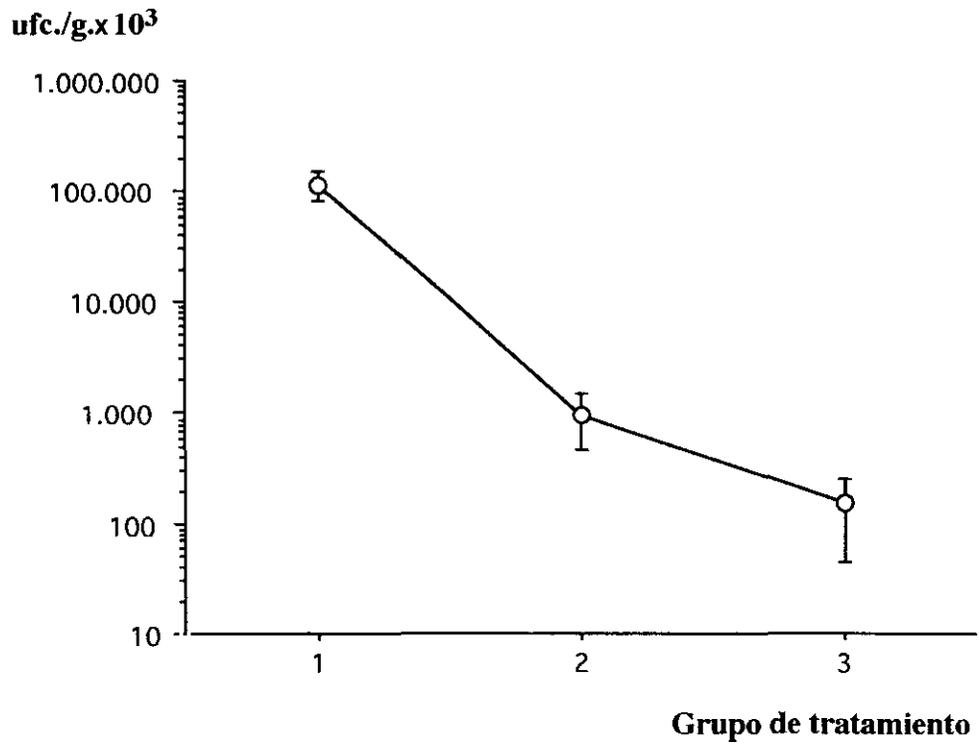
Grupo de tratamiento	Número de animales	m_x ufc./g. $\pm S_m$	cv
1	6	$1'163 \times 10^8 \pm 0'368 \times 10^8$	> 33%
2	8	$0'964 \times 10^6 \pm 0'505 \times 10^6$	> 33%
3	8	$1'500 \times 10^5 \pm 1'052 \times 10^5$	> 33%

Entre 1 y 2: $p = 0'0026$

Entre 1 y 3: $p = 0'0025$

Entre 2 y 3: $p > 0'05$

**Tabla 4.2.Ib: Modelo experimental de osteomielitis por *P. aeruginosa*:
Tratamiento con fosfomicina.
Resultados microbiológicos.**



Entre 1 y 2: $p = 0'0026$

Entre 1 y 3: $p = 0'0025$

Entre 2 y 3 : $p > 0'05$

**Fig. 4.2.I: Modelo experimental de osteomielitis por *P. aeruginosa*:
Tratamiento con fosfomicina.**

Resultados microbiológicos ($m_x \pm S_m$). Representación semilogarítmica.

GRUPO DE TRATAMIENTO	LESION MACROSCOPICA	LESION MICROSCOPICA
1	Lesión osteolítica (100%)	Necrosis supurativa ósea (100%)
2	Lesión osteolítica (50%)	Necrosis supurativa ósea (50%)
	Sin alteraciones (50%)	Sin alteraciones (50%)
3	Lesión osteolítica (25%)	Nidus en fase de regresión (25%)
	Sin alteraciones (75%)	Sin alteraciones (75%)

Tabla 4.2.II: Modelo experimental de osteomielitis por P. aeruginosa.

Tratamiento con fosfomicina.

Resultados histopatológicos.

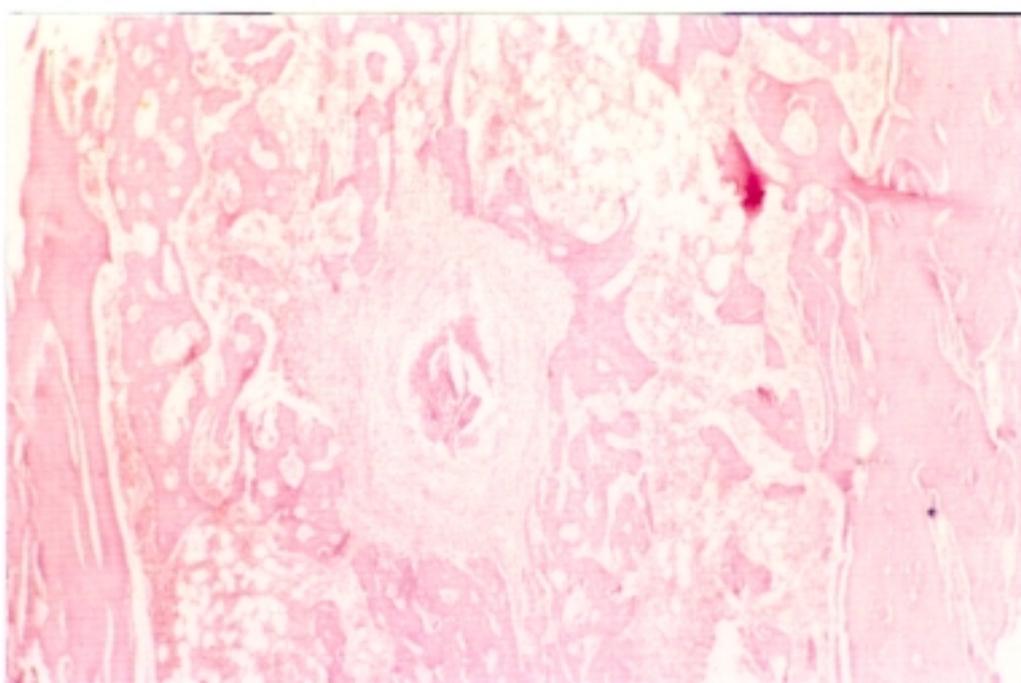


Fig. 4.2.II: Modelo experimental de osteomielitis.

“Nidus” osteomielítico.

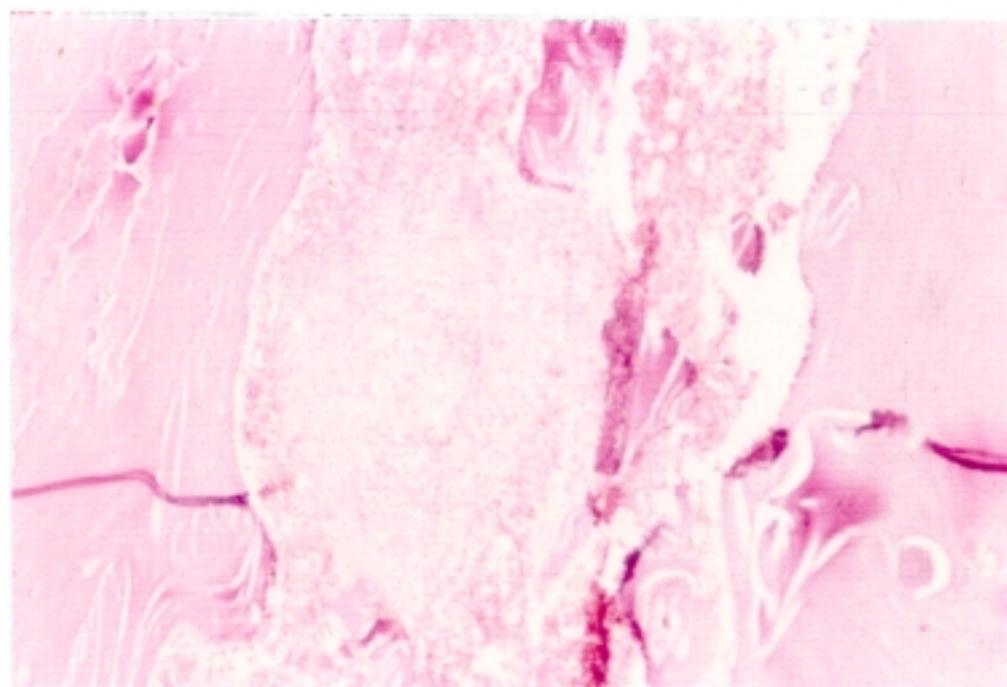


Fig. 4.2.III: Modelo experimental de osteomielitis.

“Nidus” en fase de regresión (28 días de tratamiento con fosfomicina).

4.3.- MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOMIELITIS POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA. NIVELES OSEOS DE FOSFOMICINA

Los resultados fueron homogéneos para cada grupo de muestras, presentando coeficientes de variación inferiores al 33% en todos los casos, por lo que las medias se compararon mediante la prueba de la t de Student (Tabla 4.3.I).

Tanto en “pico” como en “valle”, las concentraciones óseas de fosfomicina fueron más elevadas en el hueso enfermo que en el hueso sano, con una significación del 95'07% ($p = 0'0493$) para los niveles obtenidos una hora después de administrar el antibiótico (“pico”), y del 98'5% ($p = 0'0150$) para los obtenidos 5 minutos antes de la última dosis (“valle”).

Aun en los niveles más bajos de antimicrobiano en hueso, éstos superaron la CMI para la cepa de *P. aeruginosa* utilizada.

	Animal número	Hueso sano (1)	Hueso infectado (2)
Grupo A (5' antes)	1	10'28	17'16
	2	9'32	16'48
	3	8'04	11'24
	4	10'10	13'04
Grupo B (1 h. después)	1	117'20	130'80
	2	111'80	168'80
	3	94'40	268'00
	4	126'20	175'60

Grupo	Número de muestras	$m_x \pm S_m$	cv
A-1	4	9'435 \pm 0'510	10'8%
A-2	4	14'480 \pm 1'407	19'4%
B-1	4	112'400 \pm 6'695	11'9%
B-2	4	185'800 \pm 29'119	31'3%

A-1: Hueso sano en animales sacrificados 5 minutos antes de la última dosis.

A-2: Hueso infectado en animales sacrificados 5 minutos antes de la última dosis.

B-1: Hueso sano en animales sacrificados 1 hora después de la última dosis.

B-2: Hueso infectado en animales sacrificados 1 hora después de la última dosis.

Entre A-1 y A-2: $p = 0'0150$

Entre B-1 y B-2: $p = 0'0493$

Tabla 4.3.I: Modelo experimental de osteomielitis por *Pseudomonas aeruginosa*: Niveles óseos de fosfomicina.

Resultados expresados en mcg./g. de hueso.

4.4.- NIVELES SERICOS DE FOSFOMICINA EN RATAS “WISTAR”

4.4.1.- CURVA DE NIVELES

En la tabla 4.4.I y en la figura 4.4.I, quedan reflejados los resultados obtenidos de calcular las concentraciones plasmáticas de fosfomicina, tras la administración de 200 mg subcutáneos.

El “pico” se consiguió a los 30 minutos, con un valor de 700 ± 55.99 mcg./ml. A las 8 horas aún existía en suero una concentración próxima a la CMI del antibiótico frente a la cepa ensayada.

La curva exponencial de regresión (Fig.4.4.II), representativa de la cinética de eliminación, se ajustó a la siguiente ecuación:

$$C = 4.677'6 \times e^{-1'2 t}$$

donde C es concentración y t es el tiempo en el que se obtiene.

Representando los datos en forma de logaritmo de la concentración, obtuvimos una recta de regresión (Fig. 4.4.III) que se ajustó a la siguiente ecuación:

$$\log C = -(0'004 \times t) + 2'9$$

Esta ecuación se corresponde con la ecuación de la curva exponencial. El coeficiente de correlación ($R = 0'995$), el coeficiente de determinación ($R^2 = 0'991$) y la seguridad de la regresión ($p < 0'0001$), demostraron un buen ajuste de la recta de regresión con los valores reales observados, indicativo de una cinética lineal.

4.4.2.- CONSTANTES FARMACOCINETICAS

La $C_{m\acute{a}x}$ fue de 700 mcg./ml., con un $T_{m\acute{a}x}$ de 0'5 horas.

El valor obtenido para K_e fue de $0'58\text{ h}^{-1}$, y el de la hemivida de 1'19 horas. El \u00e1rea bajo la curva desde el tiempo 0 a 10 horas fue de 1.384'64 (mcg./ml.)h., y desde 0 a infinito de 1.390'16 (mcg./ml.)h.

Minutos	Animal número						$m_x \pm S_m$	log m_x
	1	2	3	4	5	6		
15	533'60	132'00	157'00	341'00	514'00	324'00	333'60±76'03	2'52
30	660'00	535'00		770'00	707'00	828'00	700'00±55'99	2'85
60	665'00	557'00		700'00	534'00	525'00	596'20±40'30	2'78
120	219'00	312'00	352'00	303'00	202'00	166'00	259'00±32'80	2'41
240	35'00	62'00	59'00	66'00	57'80	76'00	59'30±6'08	1'77
480	4'00	7'90	11'10	6'30	6'90	7'80	7'33±1'04	0'87
600			3'80	2'70	3'30	3'00	3'20±0'28	0'51

Tabla 4.4.I: Niveles séricos de fosfomicina en ratas "Wistar" (mcg./ml.).

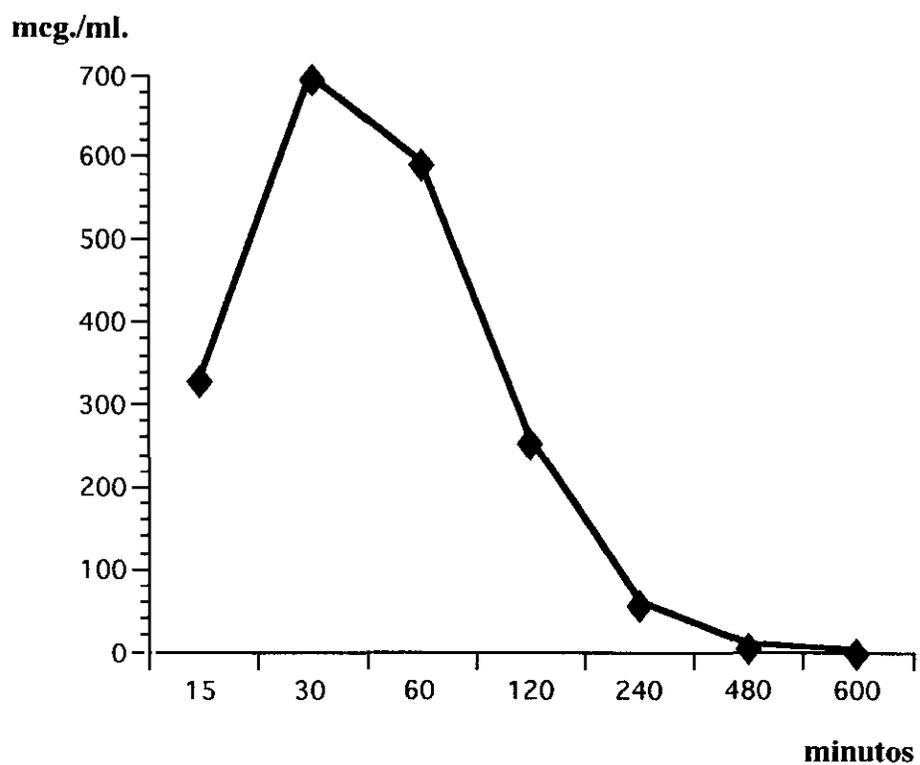


Fig. 4.4.I: Niveles séricos de fosfomicina en ratas “Wistar”.
Curva de absorción-eliminación.

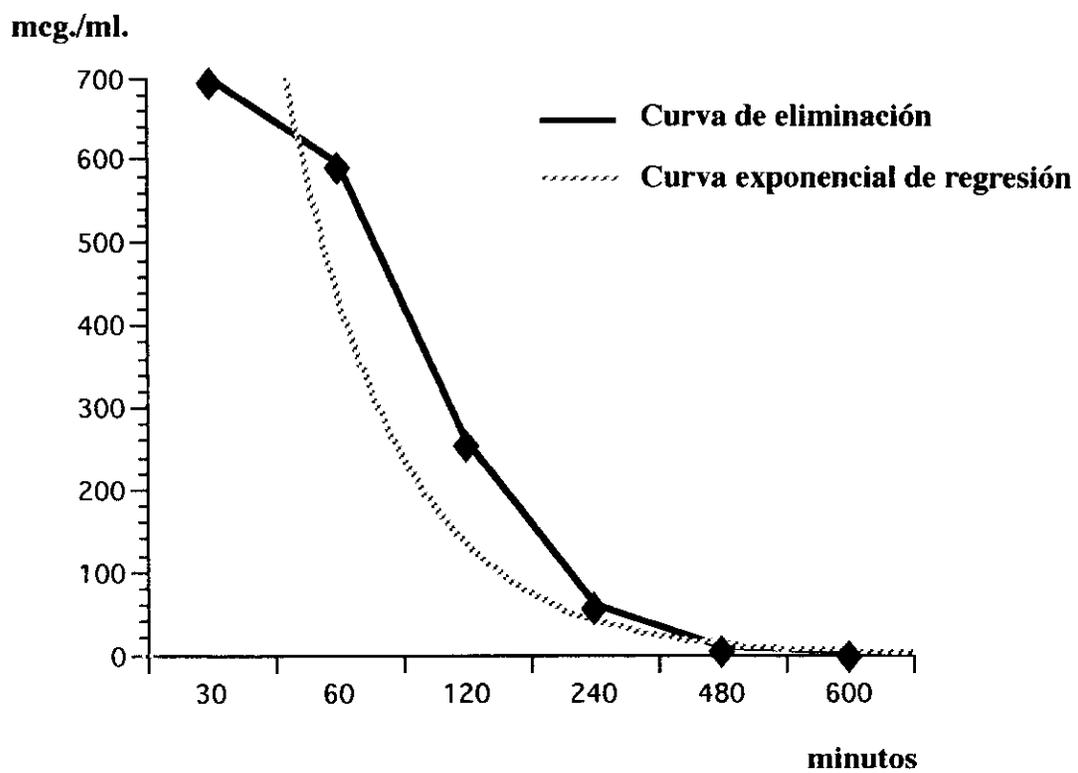


Fig. 4.4.II: Niveles séricos de fosfomicina en ratas “Wistar”.
Cinética de eliminación.

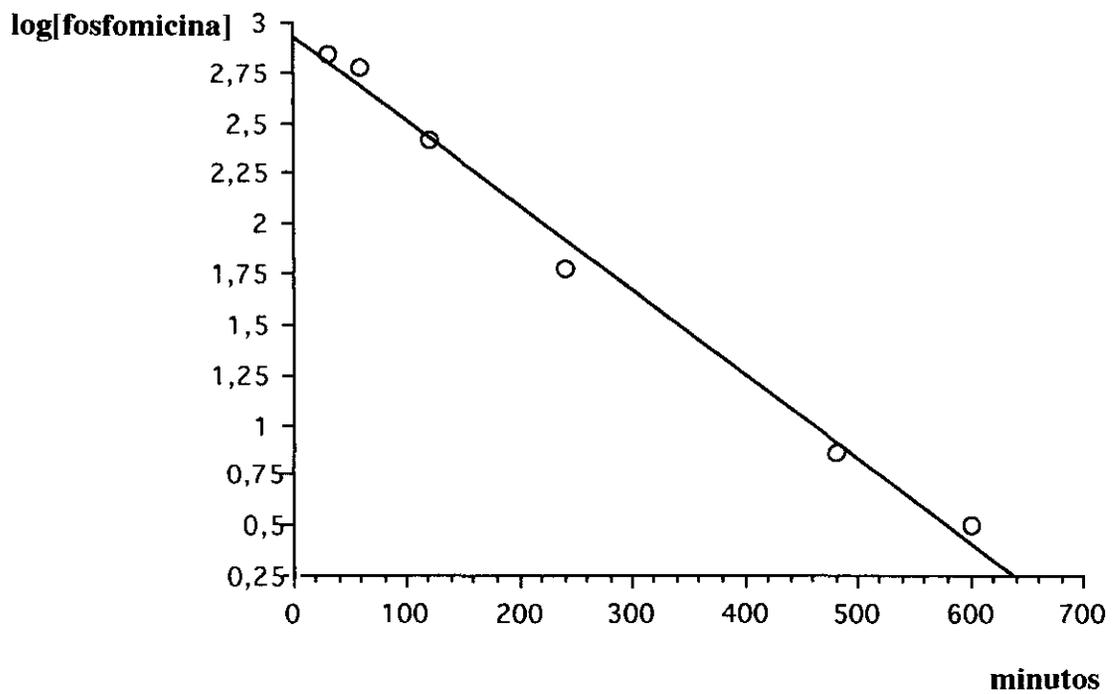


Fig. 4.4.III: Niveles séricos de fosfomicina en ratas “Wistar”.

Recta de regresión que representa la cinética de eliminación.

Representación semilogarítmica.

5.- DISCUSSION

5.1.- MODELOS EXPERIMENTALES DE OSTEOMIELITIS

5.1.1.- INTRODUCCION

Los ensayos clínicos para el tratamiento de osteomielitis en el ser humano, son difíciles de desarrollar y homogeneizar, por la gran cantidad de variables que pueden modificar los resultados¹⁷. Cuatro son los factores fundamentales que influyen en el pronóstico y respuesta al tratamiento⁶⁴: Grado de necrosis, condiciones del huésped, lugar y extensión de la enfermedad, y alteraciones debidas a la enfermedad en sí misma. Para intentar controlar estas variables y para estudiar otras facetas de la osteomielitis—como etiología, patogenia, diagnóstico, técnicas quirúrgicas, etc.—se han creado gran cantidad de modelos animales^{17,18,147,148}.

La historia de los modelos experimentales de osteomielitis comienza con Rodet²¹⁹ a finales del siglo pasado, utilizando el conejo, al que inoculó *S. aureus* por vía iv; este autor consiguió producir abscesos óseos, pero no pudo reproducir la enfermedad, pues los animales morían rápidamente por sepsis. Pocos años más tarde, Lexer²²⁰, en 1894, vuelve a intentarlo utilizando pequeñas cantidades de bacterias atenuadas. Así logró la supervivencia de los animales y, en consecuencia, el desarrollo de alteraciones en el hueso, pero sin alcanzar una infección progresiva. Más tarde, Starr²²¹ en 1922, Haldeman²²² en 1934 y Thompson y Dubos²²³ en 1938, mediante la administración de *S. aureus* por vía iv en conejos, o de forma local en el hueso, consiguieron obtener lesiones supurativas en el

lugar de la inoculación o en el punto donde la bacteria se localizó tras su inyección, pero no lograron desarrollar la enfermedad. En 1941, Scheman y cols.¹⁵⁰, en estudios similares a los anteriores, consiguieron la producción de osteomielitis en los conejos que sobrevivieron más de dos semanas, cuando administraron *S. aureus* directamente en el hueso pero asociado, por primera vez, a una sustancia esclerosante (“sodium morrhuate”), con el fin de crear una trombosis vascular y una necrosis aséptica secundaria; esta sustancia es una sal sódica de ácidos grasos saturados e insaturados de aceite de hígado de bacalao, comercializada actualmente con el nombre de Scleromate® (Palisades Pharmaceuticals, Inc.), y utilizada en clínica como agente trombosante para el tratamiento de varices y hemorroides. Cuando usaron la vía iv, la mayoría de los animales murieron en pocos días, demostrándose posteriormente la existencia de abscesos en hígado, riñones y bazo, pero sólo ocasionalmente en el hueso. El desarrollo definitivo de un modelo experimental de osteomielitis se alcanzó con las experiencias de Norden y Kennedy iniciadas en 1970¹⁴⁹; estos autores se basaron en los estudios previos de Scheman y cols., logrando un “modelo de osteomielitis crónica, cuyas manifestaciones patológicas y radiológicas son similares a la de la enfermedad en humanos”¹⁴⁹. En estos trabajos nos basamos nosotros para desarrollar el nuestro, con las modificaciones que posteriormente introdujeron Zak y cols.¹⁵¹ en 1982.

5.1.2.- MODELOS EXPERIMENTALES EN CONEJOS

El modelo de Norden y Kennedy¹⁴⁹ fue realizado en conejos blancos “Nueva Zelanda”. Insertaron una aguja percutáneamente en la cara lateral de la metafisis tibial hasta alcanzar la cavidad medular, tras afeitar la

pata del animal y limpiarla externamente con alcohol; a su través inyectaron una sustancia esclerosante (“sodium morrhuate” al 5%) seguida de una suspensión bacteriana, y a continuación suero salino estéril para asegurar la entrada de los inóculos previos. El microorganismo utilizado fue una cepa de *S. aureus* aislado de un paciente con infección ósea, y el inóculo calculado fue de 3×10^6 ufc. Entre 60 y 180 días tras la producción de la enfermedad, procedieron al sacrificio de los animales supervivientes (70%). Hicieron estudios histopatológicos en los que demostraron lesiones evidentes de osteomielitis con presencia de trayectos fistulosos y exudado purulento en el 89% de los casos. Desde el punto de vista microbiológico, recuperaron el microorganismo en el 91% de los conejos estudiados; la muestra se obtenía, tras la disección de la tibia y sección de su porción distal, inyectando proximalmente 1 ml. de tampón fosfato estéril; con el material obtenido distalmente se realizaban diluciones seriadas y siembras en placas de Petri. Hicieron hemocultivos, determinando que la frecuencia de bacteriemia disminuía conforme se distanciaban de la inoculación (86% entre 5 minutos y 6 horas; 14% a las 24 horas). También realizaron valoraciones radiológicas, observando la aparición de signos de osteomielitis entre los días 14 y 21, con abscesos de partes blandas, elevación y solución de continuidad de la línea perióstica, desestructuración ósea y depósito de hueso nuevo; estos cambios fueron mucho más marcados, con destrucción progresiva y secuestros, a los 40 y 180 días después de la inoculación. Tras el sacrificio, se observaron secuestros en el 76% de los animales.

Con el fin de establecer una relación dosis/efecto, diferentes grupos de animales recibieron inóculos distintos, obteniendo cultivos óseos positivos a los 14 días en el 100% de aquellos que habían recibido 10^4 o

10⁶ ufc; en los que fueron inoculados con 10² ufc, tan sólo se recuperó el microorganismo en un 71%.

En algunos animales, sólo se inyectó *S. aureus* o el “morrhuate”, sin que se obtuviera evidencia clínica o radiológica de osteomielitis en ningún caso; los cultivos óseos a los 14 y 60 días de la inyección fueron estériles. Así se determinó que no bastaba la inoculación bacteriana para producir la enfermedad, siendo precisa la administración local simultánea de un agente esclerosante productor de trombosis vascular.

El mismo procedimiento emplearon con otra cepa de *S. aureus* (209 P) con la que consiguieron una frecuencia similar de bacteriemias, pero no lograron desarrollar la enfermedad. También utilizaron *Proteus mirabilis* (10⁷ ufc), produciendo osteomielitis, aunque con una frecuencia menor que con *S. aureus* (56% a los 14 días y 17% a los dos meses). Los motivos para el fracaso con la cepa 209 P y para los peores resultados obtenidos con el bacilo Gram negativo no fueron esclarecidos. Aún hoy permanece sin respuesta la pregunta de porqué el *Staphylococcus aureus* es el agente más ampliamente recuperado en osteomielitis humana.

En 1973, Andriole y cols.¹⁶¹ describieron un modelo basado en el anterior pero con algunas modificaciones. El microorganismo (*S. aureus*) se introducía en la cavidad medular de conejos blancos “Nueva Zelanda” a través de una aguja insertada en un agujero previamente realizado con un microtaladro. En una serie de animales insertaron una aguja de acero en el canal medular, y en otra, además de esto, provocaron una fractura del tercio medio de la tibia. La osteomielitis se documentó microbiológicamente en el 96% de la primera serie y en el 77% de la segunda; desde el punto de vista histopatológico, los resultados fueron del 88% y 77% respectivamente. En los animales inoculados sin ninguna otra manipulación, no se logró el

desarrollo de la enfermedad. La importancia de la fractura puede seguramente descartarse a partir de estos resultados, dado que con la aguja sola se obtuvieron mejores resultados que con la fractura añadida. Sin embargo, la importancia de este modelo radica en la demostración de que, en ausencia de agente esclerosante, el implante metálico favorece la aparición de osteomielitis, tal vez porque provoque una disminución de la circulación sanguínea y una progresiva necrosis, que además protegería al microorganismo de los mecanismos de defensa, sin olvidar su papel favorecedor de la adherencia bacteriana.

El primer modelo experimental con *P. aeruginosa* fue descrito por Van Windergen y cols.¹⁶⁶ en 1974. Posteriormente, en 1980, Norden y Keleti¹²⁵ lo establecieron definitivamente. El método empleado fue idéntico al ya comentado¹⁴⁹. Se utilizaron inóculos de 10^6 y 2×10^7 ufc, respectivamente, en conejos blancos. La osteomielitis se documentó radiológica y microbiológicamente, recuperándose el microorganismo en el 90% de los animales. Lo que más llamó la atención de los autores fue que la infección resultó ser más leve y menos destructiva que con *S. aureus*, extendiéndose fuera del hueso sólo excepcionalmente; la formación de hueso nuevo también resultó ser menos llamativa.

En 1986, Mader y Wilson¹⁴⁸ reprodujeron el trabajo de Norden con algunas diferencias. En una primera fase inyectaron sólo el “morrhuate”, para, dos días más tarde, repetir la operación añadiendo la suspensión con *P. aeruginosa*. Además, emplearon un inóculo más elevado (3×10^8 ufc). Así lograron una más fácil reproducción y un desarrollo más progresivo del modelo.

En los últimos años, se han desarrollado modelos con conejos empleando otros microorganismos, aisladamente o en infección mixta. En 1990, Mayberry-Carson y cols.¹⁶⁸ provocaron osteomielitis en conejos con *S. epidermidis* y *B. thetaiotaomicron*, sin utilizar ninguna sustancia esclerosante sino la colocación de un catéter a modo de cuerpo extraño.

Posteriormente, Johansson y cols.⁶⁰ utilizaron una esponja de polivinilo para rellenar el agujero previamente taladrado en la tibia del conejo. Este proceso lo realizaron en ambas tibias de las patas traseras de cada animal, inoculando *B. fragilis* (10^7 ufc) tan sólo en una de ellas; sin embargo, el microorganismo se recuperó posteriormente en ambas extremidades, lo cual sugiere diseminación hematológica y posterior anidación de la bacteria en la tibia dañada pero sin inoculación bacteriana. Este modelo reproduce la osteomielitis hematológica que asienta sobre un territorio predispuesto, a partir de otro foco séptico. Un experimento similar había realizado anteriormente Guerrero²⁵ en un modelo realizado con conejos y a los que inoculó *E. coli*. En 12 animales, provocó la infección en una pata trasera, y en la otra introdujo tan sólo el agente esclerosante (“morrhuate”). Posteriormente, comprobó la producción de osteomielitis con recuperación del microorganismo en el 64% de las patas a las que no les había realizado inoculación bacteriana alguna.

Lambe y cols.⁶¹ en 1991 colocaron un catéter en la cavidad medular de la tibia del animal, y a su través inocularon *S. epidermidis* y/o *B. fragilis*. Lograron la producción de osteomielitis en el 100% de los casos de infección mixta, pero sólo en el 40% cuando utilizaron *S. epidermidis* aisladamente. Con *B. fragilis* también obtuvieron un 100% de resultados positivos. Con estudios de microscopía electrónica, demostraron que, en los casos de infección por ambos microorganismos, *S. epidermidis* era la bacteria predominante en el catéter, y *B. fragilis* lo era sin embargo en el

hueso infectado. Estos resultados corroboran los hallazgos clínicos que comprueban la asociación del estafilococo a biomateriales e implantes^{28,46}. Por otro lado, están a favor de que la infección polimicrobiana juega un papel importante como factor implicado en la génesis de la osteomielitis⁶³.

Mayberry-Carson y cols.⁶² en 1992 reprodujeron su modelo descrito previamente, utilizando *S. epidermidis* y *B. thetaiotaomicron* de nuevo, pero comparando dos grupos de conejos, con y sin introducción de un cuerpo extraño. En el primer grupo, los cultivos fueron positivos en el 97% de los casos, comprobándose la producción de osteomielitis con técnicas radiológicas e histopatológicas en un 83% de los animales. Sin embargo, en el segundo grupo tan sólo se comprobó la enfermedad en un 58%, con negatividad de todos los cultivos realizados. Así pues, se comprueba que, en ausencia de un agente esclerosante, es precisa la colocación de un cuerpo extraño para provocar osteomielitis experimentalmente, extremo éste ya demostrado hace dos décadas por Andriole y cols.¹⁶¹

A pesar de haber sido los animales más utilizados en los modelos experimentales de infección ósea, los conejos presentan una limitación importante, debida a su sensibilidad a los efectos tóxicos de los antibióticos, sobre todo cuando éstos se emplean a altas dosis o durante tiempo prolongado, ocasionando una importante mortalidad secundaria mediada por diarreas inespecíficas o colitis pseudomembranosa²²⁴. Por este motivo, Zak y cols.¹⁵¹ utilizaron la rata en 1982 como animal de ensayo para el estudio de la osteomielitis.

5.1.3.- *MODELOS EXPERIMENTALES EN RATAS*

Zak y cols¹⁵¹ se basaron en el método de Norden y Kennedy¹⁴⁹, pero empleando ratas “Wistar”. Tras rasurar la tibia de la pata trasera izquierda del animal, la taladraron en su parte proximal, hasta la cavidad medular, con un “drill” de dentista. Inocularon 0’05 ml. de “sodium morrhuate” al 5%, seguido de la misma cantidad de una suspensión de *S. aureus*. Obturaron el agujero con cemento dental y cerraron la herida. Se desarrolló osteomielitis a los 14 días de la inducción de la infección, con sus caracteres histológicos de supuración crónica, microabscesos, y fragmentos de hueso necrosado, rodeados de una infiltración de neutrófilos. A los 30, 60 y 120 días tras la inoculación, se comprobó la producción de una osteomielitis crónica similar a la humana postraumática, con áreas de microabscesos, formación de hueso reactivo, secuestros y un infiltrado inflamatorio crónico con macrófagos.

El modelo resultó fácil de manejar y económico; las lesiones histológicas fueron similares a las encontradas en el ser humano. La rata manifiesta menos efectos secundarios con los antibióticos en altas dosis y por períodos de tiempo prolongados. La tibia de la rata es fácil de disecar y de pulverizar, favoreciendo los estudios.

En 1985, Rissing y cols.¹⁶⁹ describieron otro modelo en ratas “Sprague Dawley”, con *S. aureus*. Utilizaron el método de Zak¹⁵¹ comparándolo con el de Norden¹⁴⁹, pero en la rata. Comprobaron que la técnica que emplea la aguja percutánea no sólo era más dificultosa, sino, además, de menor eficacia.

En 1989, nosotros describimos el primer modelo experimental en la rata por agentes Gram negativos¹⁹. Posteriormente, Nelson¹³⁰ publicó un estudio muy similar, con la diferencia de que no utilizó substancia esclerosante alguna ni obturó el taladro óseo, intentando evitar cuerpos extraños u otros factores ajenos a la propia inoculación. Logró el desarrollo de la infección, pero, en nuestra opinión, este trabajo no tiene en cuenta que la acción del taladro actúa como una quemadura física, provocando la aparición de restos necróticos de forma inevitable. En cualquier caso, y como ahora comentaremos, nosotros consideramos que el agente esclerosante garantiza el desarrollo de la osteomielitis y su uso es aconsejable.

Recientemente, Spagnolo y cols.²²⁵ han utilizado “fibrin glue” (fibrina humana liofilizada), en lugar de un agente esclerosante o un cuerpo extraño, provocando osteomielitis por *S. aureus*, con demostración radiológica, histopatológica y microbiológica. Esta substancia es un material biocompatible que no causa trombosis vascular como los agentes esclerosantes, ni actúa a modo de material inerte que favorezca la adherencia del microorganismo como los cuerpos extraños^{29,61}, dado que se reabsorbe en pocos días. Los autores consideran que constituye un excelente medio de cultivo, favoreciendo el crecimiento bacteriano en su seno, pero al mismo tiempo provoca un atrapamiento del microorganismo, previniendo la aparición de sepsis, y disminuyendo así la mortalidad de los animales.

5.1.4.- MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOMIELITIS EN RATAS “WISTAR” POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA

El poseer en nuestras hospitalizaciones un alto porcentaje de osteomielitis en pie del diabético, úlceras por presión y osteomielitis postraumáticas y postquirúrgicas, de carácter crónico, con un considerable incremento de aislamientos de bacilos Gram negativos⁵, fue lo que nos motivó a la creación de un modelo experimental en ratas “Wistar”; seguimos las técnicas ya referidas de Scheman y cols.¹⁵⁰, Norden y Kennedy¹⁴⁹ y Zak y cols.¹⁵¹ Elegimos la rata atendiendo a las ventajas ya conocidas previamente de su economía, manejabilidad, resistencia a tratamientos prolongados y con altas dosis de antimicrobianos, y semejanza de las lesiones con la osteomielitis crónica postraumática, circunstancias demostradas en la experiencia de Zak y cols.¹⁵¹ en 1982.

Aunque intentamos llegar a la cavidad medular con una aguja percutánea, encontramos grandes dificultades para conseguir su enclavamiento, por lo que finalmente optamos por el empleo de un microtaladro para acceder a dicha cavidad. En el canal así creado, insertamos una aguja por la que inoculamos el agente esclerosante, el microorganismo y la solución salina estéril, que nos aseguraba la entrada de los anteriores elementos.

Dificultades para conseguir el “morrhuate” nos hicieron optar por otros agentes que fueran capaces de provocar lesiones similares; tras su comprobación histopatológica, nos inclinamos por una solución de sulfato de bario estéril. Las lesiones provocadas por el taladro y por el sulfato de bario, aisladamente y en combinación, eran de esclerosis medular localizada y destrucción trabecular. Ni activación osteoblástica hacia la

formación de involucro, ni infiltración por polimorfonucleares, como respuesta al agente inoculado, fueron posibles de describir, con carácter llamativo, en los estudios histopatológicos que realizamos en dos lotes de 8 ratas, con sacrificios a las 24 horas, 3, 7 y 14 días.

El inóculo de *P. aeruginosa* estaba constituido por 10^8 ufc, y se obtuvo de un aislado clínico de osteomielitis. Una vez realizada la inoculación, retiramos la aguja y cerramos la cavidad con cera estéril.

A los 7, 14, 28 y 56 días de la manipulación, llevamos a cabo los sacrificios. La mortalidad previa al mismo fue del 20%. Las causas de las muertes se atribuyeron a excesos en la anestesia y probablemente a sepsis, aunque no lo pudimos demostrar, pues los animales que murieron lo hicieron en los dos días posteriores a la inoculación.

En el estudio macroscópico, la lesión se hizo evidente a los 14 días, con osteolisis y deformación ósea, que en microscopía coincidía con necrosis destructiva supurada. En el primer sacrificio a los 7 días no se demostró lesión, ni en macroscopía ni en microscopía. Las lesiones a los 28 días eran similares a las de los 14 días, salvo que empezaron a apreciarse secuestros óseos. A los 56 días existía un predominio de tejido de granulación y esclerosis.

La recuperación del microorganismo se produjo en todos los animales, con un incremento significativo en el número de unidades formadoras de colonias por gramo de hueso, indicativo, junto con los hallazgos histopatológicos, de una progresión de la enfermedad conforme el tiempo pasaba.

Consideramos por tanto que a partir del día 14 la osteomielitis estaba desarrollada, por lo que en ese momento podíamos realizar ensayos terapéuticos.

5.1.5.- MODELOS EXPERIMENTALES CON OTROS ANIMALES

Esta revisión sobre modelos experimentales de osteomielitis no estaría completa, si no presentáramos unos breves apuntes acerca de la utilización de otros animales diferentes del conejo o la rata.

El perro fue utilizado por Deysine y cols.¹⁵² en 1976. Para ello, introdujeron en la arteria nutricia tibial sulfato de bario al 20% y una solución de *S. aureus*. El estudio radiológico demostró la presencia de pérdida de hueso en la cortical, seguida de una progresiva neoformación ósea periostal. Histopatológicamente se halló necrosis y neoformación ósea, y en el cultivo se recuperó el microorganismo.

Fitzgerald¹⁵³ en 1983, consiguió una osteomielitis progresiva demostrada radiológica, histopatológica y microbiológicamente, mediante la inoculación de una suspensión de *S. aureus* en una zona de la metafisis tibial en la que se había extirpado previamente un área de hueso y que posteriormente se rellenaba con un cemento de polimetilmetacrilato.

Ambos modelos corresponden a osteomielitis subagudas. Los modelos en perros permiten el ensayo de múltiples procedimientos quirúrgicos, debido a su tamaño. Además son resistentes a los efectos tóxicos de los antibióticos. Sin embargo tienen el problema de su elevado coste, y la dificultad de obtener los animales en grupos homogéneos.

En 1983, Emslie y Nade¹⁵⁴ crearon un modelo de osteomielitis aguda hematógena en pollos, mediante la administración de *S. aureus* por vía iv, fiel reflejo de la que se observa en el ser humano. Demostraron la

presencia de la bacteria en los vasos del cartílago de crecimiento a las 24 horas de la inoculación, y abscesos y secuestros a los 2 y 8 días respectivamente.

Passl y cols.¹⁵⁵ elaboraron un modelo de osteomielitis en cobayas. Inocularon *S. aureus* o *E. coli* en el fémur, en el lugar donde previamente habían realizado una fractura y colocado un alambre de acero inoxidable, obteniendo mejores resultados con el primero de los dos microorganismos ensayados.

Finalmente, Wannfors y Hammarstrom¹⁵⁶ implantaron raíces dentales, infectadas por flora propia oral, a monos “Macaca Fascicularis”, obteniendo cambios inflamatorios en la mandíbula manipulada similares a los que se observan en la osteomielitis, pero sin lograr crecimiento alguno en los cultivos bacterianos. Sólo obtuvieron microorganismos de las propias raíces previamente implantadas, pero no del hueso mandibular.

5.1.6.- TRATAMIENTO ANTIMICROBIANO EN MODELOS EXPERIMENTALES

Para finalizar con este apartado de la discusión, y a modo de, en cierta forma, introducción para el siguiente, comentaremos brevemente los tratamientos más utilizados en los modelos experimentales de osteomielitis.

El microorganismo frente al cual más se ha ensayado ha sido, sin lugar a dudas, el *Staphylococcus aureus*, tanto en monoterapia (Tabla 5.1.I) como con la combinación de diferentes antibacterianos (Tabla 5.1.II).

Los mejores resultados se obtuvieron cuando se iniciaba la administración del antimicrobiano inmediatamente tras la inducción de la infección. Sin embargo, ésto no es correcto, dado que aún no se ha desarrollado la enfermedad en su forma crónica. Para considerar válidos los ensayos, el tratamiento debe iniciarse al menos 14 días tras la inoculación.

Tanto en monoterapia como con tratamientos combinados, han dado mejor resultado las pautas largas (28 días) que las cortas (14 días)^{151,163,226}. Asimismo se ha comprobado que habitualmente las asociaciones de antimicrobianos han sido superiores a los tratamientos por un solo agente^{26,85,86,106,151,164,227}.

Frente a *Pseudomonas aeruginosa* los ensayos terapéuticos son mucho menos numerosos (Tabla 5.1.III), lo cual es lógico, al ser mucho menor el número de modelos desarrollados. También aquí se ha comprobado la mayor eficacia de la combinación de antimicrobianos frente a los tratamientos únicos^{125,166}, así como de las pautas largas frente a las cortas^{87,88,125,166}, aunque nosotros obtuvimos resultados aceptables con algún tratamiento de tan solo 10 días⁸⁰. Hasta nuestro trabajo, no se ha realizado ningún modelo experimental de osteomielitis por *Pseudomonas aeruginosa* empleando fosfomicina como agente terapéutico.

Con otros microorganismos, se han ensayado fosfomicina²⁵ y cefotaxima¹⁵⁷ frente a *E. coli*, ciprofloxacino¹⁶⁸ frente a *S. epidermidis* y *B. thetaiotaomicron* en infección mixta, y metronidazol²²⁸ frente a *B. fragilis*.

ANTIMICROBIANO	AUTORES	AÑO(CITA)
Cefalotina	Norden y Kennedy	1971 (162)
	Norden	1975 (106)
	Mader y Wilson	1983 (229)
Lincomicina	Norden y Kennedy	1971 (162)
Cefaloridina	Norden y Dickens	1973 (163)
Rifampicina	Norden	1975 (106)
	Zak y cols.	1982 (151)
	Henry y cols.	1985 (86)
	Luu y cols.	1987 (226)
	Henry y cols.	1987 (85)
Gentamicina	Norden	1975 (106)
Sisomicina	Norden	1975 (106)
	Norden	1978 (164)
Oxacilina	Norden	1978 (164)
	Rissing y cols.	1985 (169)
Cloxacilina	Zak y cols.	1982 (151)
Cefamandol	Mader y Wilson	1983 (228)
Fosfomicina	Olay y cols.	1983 (26)
Cefazolina	Olay y cols.	1983 (26)
	Mader	1989 (230)
Ciprofloxacino	Henry y cols.	1985 (86)
	Henry y cols.	1987 (85)
Vancomicina	Henry y cols.	1985 (86)
	Luu y cols.	1987 (226)
	Henry y cols.	1987 (85)
Ceftriaxona	Rissing y cols.	1985 (169)
Clindamicina	Norden y cols.	1986 (225)
	Mader	1989 (229)
Ampicilina-Sulbactam	Norden y Budinsky	1990 (77)

Tabla 5.1.I: Antimicrobianos utilizados en osteomielitis experimental por *S. aureus* (Monoterapia).

ANTIMICROBIANOS	AUTORES	AÑO(CITA)
Rifampicina/Gentamicina	Norden	1975 (106)
Rifampicina/Sisomicina	Norden	1975 (106)
Rifampicina/Cefalotina	Norden	1975 (106)
Rifampicina/Sisomicina/Cefalotina	Norden	1975 (106)
Oxacilina/Sisomicina	Norden	1978 (164)
Rifampicina/Cloxacilina	Zak y cols.	1982 (151)
Fosfomicina/Cefazolina	Olay y cols.	1983 (26)
Rifampicina/Ciprofloxacino	Henry y cols.	1985 (86)
	Henry y cols.	1987 (85)
Rifampicina/Vancomicina	Henry y cols.	1985 (86)
	Luu y cols.	1987 (226)
	Henry y cols.	1987 (85)

Tabla 5.1.II: Antimicrobianos utilizados en osteomielitis experimental por *S. aureus* (Tratamiento combinado).

ANTIMICROBIANOS	AUTORES	AÑO(CITA)
Carbenicilina	Van Windergeren y cols.	1974 (166)
	Norden y Keleti	1980 (125)
Sisomicina	Van Windergeren y cols.	1974 (166)
	Norden y Keleti	1980 (125)
Carbenicilina/Sisomicina	Van Windergeren y cols.	1974 (166)
	Norden y Keleti	1980 (125)
Ciprofloxacino	Norden y Shinnors	1985 (88)
Tobramicina	Norden y Shinnors	1985 (88)
Ofloxacino	Norden y Niederriter	1987 (87)
Aztreonam	Norden y Budinsky	1988 (231)
Imipenem	Herranz y cols.	1989 (80)
Ceftazidima	Gomis y cols.	1990 (160)
	Nelson y cols.	1990 (130)
Ceftazidima/Tobramicina	Nelson y cols.	1990 (130)
Piperacilina	Gomis y cols.	1991 (159)

Tabla 5.1.III: Antimicrobianos utilizados en osteomielitis experimental por *Pseudomonas aeruginosa*.

5.2.- OSTEOMIELITIS EXPERIMENTAL. TRATAMIENTO CON FOSFOMICINA

5.2.1.- TRATAMIENTO CON FOSFOMICINA EN MODELOS EXPERIMENTALES

Como ya se ha comentado, son escasísimos los modelos experimentales de osteomielitis que han utilizado fosfomicina como agente terapéutico, y, hasta nuestro trabajo, no se ha ensayado frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

En 1983, Olay y cols.²⁶ desarrollaron un modelo de osteomielitis en conejos blancos “Nueva Zelanda”, empleando el método de Norden y Kennedy¹⁴⁹. Para ello, inocularon en la cavidad intramedular de la metáfisis tibial de 40 conejos, una suspensión de *S. aureus* (2.5×10^7 ufc) obtenido de un aislamiento clínico de osteomielitis, tras haber inyectado “morrhuate” como agente esclerosante. A los 14 días de haber provocado la infección, y tras comprobar la existencia de cambios radiológicos, dividieron a los animales supervivientes (32) en cuatro grupos: control, tratamiento con cefazolina, tratamiento con fosfomicina y tratamiento combinado. Previamente habían comprobado la acción sinérgica “in vitro” de ambos antimicrobianos. El tratamiento se mantuvo durante 28 días y los animales fueron sacrificados 4 semanas después de su finalización. Realizaron estudios radiológicos, histopatológicos y microbiológicos. Los resultados demostraron que la combinación de fosfomicina y cefazolina fue superior a cada antimicrobiano por separado, tanto desde el punto de vista histopatológico (45% de secuestros con la combinación, frente a 75% con

fosfomicina y 86% con cefazolina) como desde el microbiológico (una esterilización con cada antimicrobiano y 4 con la combinación; la media de ufc./g. de hueso fue significativamente más baja con ambos antimicrobianos que con fosfomicina; comparando con cefazolina, también hubo menor crecimiento bacteriano con la combinación, pero sin significación estadística). La CMI frente al microorganismo, se mantuvo al final del tratamiento igual que previamente al mismo (fosfomicina: 8 mcg./ml.; cefazolina: 1 mcg./ml.).

Guerrero²⁵ en 1987 utilizó el mismo método, pero en lugar de *S. aureus*, inoculó 10⁶ ufc de *E. coli*, igualmente obtenido de un enfermo con osteomielitis. 24 animales fueron divididos en dos grupos: a 12 de ellos les provocó la infección en una pata trasera; a los otros 12, además, les inoculó el “morrhuate”, sin suspensión bacteriana, en la otra pata. Realizó estudios clínicos, radiológicos y gammagráficos para observar la evolución. A los 14 días de la inoculación, inició el tratamiento con fosfomicina, en monoterapia, a los animales a los que sólo se les había manipulado una pata, manteniéndolo durante 4 semanas. Tras el sacrificio, se obtuvieron cultivos positivos en 2 de los 12 conejos tratados (17%). En los conejos no tratados, se recuperó el microorganismo en el 71% de las tibias estudiadas (17 de 24); en el 64% de las tibias en las que sólo se inoculó el agente esclerosante, el cultivo fue positivo, confirmando la existencia de una bacteriemia con anidación de la bacteria en el territorio predispuesto por la manipulación.

5.2.2.- MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOMIELITIS POR P. AERUGINOSA: TRATAMIENTO CON FOSFOMICINA

Para nuestro trabajo, utilizamos un lote homogéneo de 40 ratas “Wistar”, adultas, hembras, a las cuales, siguiendo el método de Zak y cols.¹⁵¹, provocamos la infección con una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* obtenida de un aislamiento clínico de osteomielitis; la CMI de fosfomicina era de 8 mcg./ml. Tras el inóculo, 6 animales murieron, todos en las primeras 48 horas. No se realizó estudio necróptico, por lo que la causa de las muertes no pudieron determinarse con exactitud; se atribuyeron a efectos de la anestesia, o a sepsis, particularmente en 4 ratas que murieron pasadas las primeras 24 horas.

Disponíamos ya de una amplia experiencia con este modelo^{19,80,157,160}, habiendo comprobado en todos nuestros estudios que obteníamos un 100% de cultivos positivos en los animales no tratados. Sin embargo, establecimos un grupo control sin tratamiento, para asegurar la validez de los resultados. También se establecieron dos grupos de animales a los que se trató con fosfomicina, diferenciándose tan sólo en el número de días durante los cuales iban a ser tratados. Para calcular la dosis del antibiótico, se utilizó el concepto, aportado por Freireich y cols.²¹³, de ajustarla en función de la superficie corporal y no sólo del peso.

Se realizó estudio microbiológico en 8 animales de cada grupo de tratamiento, constituídos por 12 ratas cada uno. En los animales tratados durante 14 días obtuvimos esterilización del hueso en un 50%, cifra que se elevó hasta el 75% cuando el período terapéutico fue de 28 días. Para comparar el número de unidades formadoras de colonias por gramo de hueso en relación con el grupo control, aplicamos dos métodos estadísticos

diferentes. La prueba de la t de Student es probablemente la más empleada para muestras pequeñas, y por este motivo consideramos conveniente su utilización. Sin embargo, la alta dispersión existente en los grupos de tratamiento, lógicamente debida a las esterilizaciones, nos creaba la duda de la validez de este método. Por este motivo, quisimos corroborar los resultados mediante pruebas no paramétricas, necesarias cuando las muestras no siguen una distribución “normal” o de Gauss y son menores de 30 individuos²¹¹. Estas pruebas manejan rangos, no valores cuantitativos, por lo que son de menor precisión, pero, precisamente por ello, es por lo que son mucho más exigentes, demostrando como significativas diferencias mayores²¹¹. En cualquier caso, obtuvimos unas probabilidades de que las diferencias fueran debidas al azar muy bajas, con cualquiera de los dos sistemas empleados (para el grupo de 14 días de tratamiento, $p = 0'0026$ con la t de Student y $p = 0'0019$ con la U de Mann-Whitney; para el grupo de 28 días, $p = 0'0025$ y $p = 0'0019$ respectivamente). Las diferencias encontradas entre ambos grupos de tratamiento no fueron significativas.

Los resultados histopatológicos se correspondieron fielmente con los datos obtenidos en el estudio microbiológico. Así, mientras en los animales no tratados el 100% presentaban “nidus” osteomielíticos, esta cifra descendía al 50% en las ratas tratadas durante 14 días, observándose tan sólo un “nidus” en fase de regresión en uno de los animales que fueron tratados durante 28 días, sin lesiones osteomielíticas en el resto de las tibias.

Así pues, fosfomicina demostró una clara utilidad en nuestro modelo experimental para el tratamiento de la infección ósea por *P. aeruginosa*. Comparando nuestros resultados con los obtenidos por otros autores con fosfomicina frente a *S. aureus* en modelos experimentales, podemos afirmar que superamos ampliamente los de Olay y cols.²⁶ cuando

utilizaron monoterapia, y con respecto al trabajo de Guerrero²⁵, hemos obtenido unos resultados bastante similares.

Otros autores emplearon diferentes antimicrobianos para tratar la osteomielitis experimental por *P. aeruginosa* en conejos. Van Winderen y cols.¹⁶⁶ en 1974, la trataron con sisomicina y carbenicilina solas y en combinación. Los resultados obtenidos con cada uno de ellos por separado fueron bastante desalentadores, al igual que la combinación durante sólo 14 días. Sin embargo, con ambos fármacos combinados durante 4 semanas, lograron un 95% de esterilizaciones. La única pega que se puede poner a estos trabajos es que el tratamiento lo iniciaron a los 10 días de provocar la infección, momento en el cual no está claro que ya se haya desarrollado la enfermedad.

Norden y Keleti¹²⁵ en 1980, utilizaron los mismos antibacterianos, obteniendo resultados tan sólo aceptables con la combinación (14 días: 40% de esterilizaciones; 28 días: 70%) y muy malos con cada uno de ellos aisladamente (carbenicilina: 5% de esterilizaciones; sisomicina: 14%). Esto se atribuyó a la gran cantidad de iones de calcio y de magnesio presentes en el hueso, a la baja tensión de oxígeno en el territorio infectado y/o a la disminución del pH en dicho territorio, circunstancias éstas que disminuyen la acción de los aminoglucósidos^{11,111}. Además, las concentraciones de carbenicilina en el hueso alcanzaron bajos niveles.

En 1985, Norden y Shinnars⁸⁸ volvieron a comprobar la ineficacia de los aminoglucósidos en la osteomielitis experimental, obteniendo tan solo un 5% de esterilizaciones con tobramicina durante 28 días de tratamiento, mientras que con ciprofloxacino lograron un 94%.

Posteriormente, en 1987, Norden y Niederriter⁸⁷ ensayaron otra quinolona fluorada, ofloxacino, logrando un 94% de esterilizaciones tras 28 días de tratamiento; con 14 días, el resultado fue de un 11% de cultivos positivos.

En 1988, Norden y Budinsky²³¹ utilizaron aztreonam, sin conseguir ninguna esterilización en los conejos tratados. Este fracaso lo atribuyeron a los bajos niveles de antimicrobiano en el hueso infectado.

En los últimos años se han desarrollado algunos modelos de osteomielitis por *P. aeruginosa* en ratas. Nelson y cols¹³⁰ en 1990, fracasaron con ceftazidima y ésta combinada con tobramicina, no obteniendo ninguna esterilización ni diferencias significativas en los cultivos de los animales tratados cuando se compararon con el grupo control.

Nosotros ensayamos imipenem⁸⁰ durante 10 días, y, aunque no logramos esterilizaciones más que en el 9% de los animales tratados, los cultivos fueron significativamente más bajos que en el grupo control. Con ceftazidima¹⁶⁰ conseguimos un 57% de esterilizaciones tras 28 días de tratamiento y con piperacilina¹⁵⁹ una disminución significativa de los cultivos obtenidos de los animales tratados durante 28 días, con normalización de los estudios histopatológicos.

A la vista de estos datos, consideramos que fosfomicina se ha mostrado superior o equivalente, en la osteomielitis experimental por *P. aeruginosa*, a otros antimicrobianos clásicamente considerados como antipseudomónicos, con mucha mayor eficacia que los aminoglucósidos y sólo discretamente inferior a las modernas quinolonas fluoradas.

En nuestro trabajo, aunque logramos más esterilizaciones con 28 días de tratamiento que con 14, las diferencias al comparar la media de

ufc./g. de hueso no resultaron significativas. Es ésta una cuestión que aún está pendiente de aclaración. ¿Basta con 14 días de tratamiento, o son necesarias un mínimo de 4 semanas para tratar eficazmente la osteomielitis? La mayoría de los trabajos experimentales demuestran la superioridad de los tratamientos “largos”, tanto frente a *S aureus*^{162,163,226}, como con *Pseudomonas*^{87,88,166,232}. Sin embargo, los tratamientos “cortos” se han mostrado eficaces en algunos modelos^{80,160,162,227}. Tal vez, a la vista de nuestros resultados, sea necesario ampliar los estudios para determinar si, en el caso concreto de fosfomicina, son equivalentes 14 y 28 días de tratamiento.

A partir de los datos obtenidos en nuestro modelo tratado con fosfomicina, consideramos que éstos alientan al uso de este antimicrobiano para el tratamiento de la osteomielitis por *P. aeruginosa*. Pero, al hacer este planteamiento, surge inmediatamente una cuestión: el problema de la resistencia “natural” de *P. aeruginosa* a fosfomicina. Evidentemente, este antibiótico no es un fármaco de primera elección como antipseudomónico, pero también es cierto que no está desprovisto de acción frente a este microorganismo. Además, su escaso uso puede incluso ser una ventaja respecto a otros antimicrobianos por el escaso desarrollo de resistencias. Así, Rodríguez Creixems¹⁴ publicó en 1992 un estudio multicéntrico en el que se demuestra una importante disminución de la sensibilidad de *S. aureus* a muchos antimicrobianos entre 1986 y 1990 (oxacilina presentó una disminución del 98'5% al 88'8%; cefalotina, del 100% al 88'8%; cefazolina, del 99'4% al 88'3%; cefotaxima, del 98'9% al 86'4%; ceftazidima, del 79'8% al 39'3%; tobramicina, del 95'3% al 84'9%; eritromicina, del 92'8% al 75'7%; clindamicina, del 98'4% al 84'4%; ciprofloxacino, del 99'4% al 83'4%). Fosfomicina se mantuvo

prácticamente en el mismo nivel de efectividad (del 96'9% al 95'6%). Con respecto a *P. aeruginosa*, hay evidentemente trabajos que estudian su sensibilidad a diferentes antibacterianos^{233,234}, habiéndose comprobado su elevado y creciente nivel de resistencias (29% para betalactámicos y 21% para aminoglucósidos), pero habitualmente no se estudia fosfomicina, lo cual es lógico pues, como ya se ha comentado, este antibiótico no es considerado un antipseudomónico. Sin embargo, en algún trabajo en el que sí se ha estudiado, se ha comprobado una aceptable actividad frente a este microorganismo, habiendo aumentado el nivel de resistencia tan solo desde un 29% hasta un 31% en un estudio que abarcó 12 años de intervalo¹⁸⁸.

Otra cuestión importante es la del desarrollo de resistencias durante el tratamiento. Ciertamente, ésto se ha descrito con casi todos los antimicrobianos y con muchos, por no decir todos, los microorganismos²³⁵; pero también es verdad que *P. aeruginosa* las desarrolla en un porcentaje más elevado que otras bacterias^{143,144,235}, y que con fosfomicina es frecuente su aparición, sobre todo si se emplea en monoterapia¹⁷¹. En nuestro modelo sin embargo, la CMI de fosfomicina frente a la cepa ensayada no varió significativamente con el tratamiento. Pero lo cierto es que son abundantes las descripciones de detección de resistencia o sobreinfección por *Pseudomonas* resistentes durante el tratamiento de osteomielitis^{12,48,97} y de otros procesos^{12,143,144,236} con diferentes antimicrobianos. Este fenómeno también se ha estudiado "in vitro"²³⁷. Igualmente se ha descrito en tratamientos con fosfomicina de osteomielitis en clínica humana^{25,202} y en algún modelo experimental²⁵.

En relación con el problema de las resistencias, surge otra pregunta importante: ¿monoterapia o tratamiento combinado? En algunos trabajos se ha encontrado una menor incidencia de resistencias durante el

tratamiento combinado al compararlo con la monoterapia²³⁵, pero otros autores consideran que esto no es la norma²². Por otra parte, la búsqueda de un efecto postantibiótico por parte de los antimicrobianos estaría a favor de la asociación, dado que parece que las combinaciones de éstos potencian el EPA de cada uno de ellos por separado²², aunque en algunos estudios donde se ha comparado el EPA de ciertos antibacterianos aisladamente o en combinación, se ha encontrado indiferencia (ciprofloxacino-fosfomicina) o incluso antagonismo (ciprofloxacino-vancomicina)²³⁸. El que la infección sea mono o polimicrobiana, no parece tener importancia con respecto al EPA de los antimicrobianos^{239,240}.

En general, los modelos experimentales han demostrado un efecto beneficioso de los tratamientos combinados comparados con los que utilizan un solo agente antibacteriano, tanto con *P. aeruginosa*^{125,166}, como con *S. aureus*^{26,86,106,151,164}. Sin embargo, especialmente en los últimos años, algunos modelos han demostrado la eficacia y seguridad de los tratamientos con monoterapia^{80,87,88,157,159,160,230}. Nosotros, en el trabajo que aquí se presenta, hemos conseguido la esterilización del 75% de los animales, dato que consideramos claramente positivo. Además, intentando disminuir los efectos tóxicos de los antibióticos, la monoterapia se ha utilizado en clínica humana con buenos resultados^{6,48,70-75,79,92,103}.

Por otra parte, el tratamiento combinado permite la acción sinérgica de los antibióticos, habiéndose demostrado ésta entre fosfomicina y numerosos antimicrobianos, incluidos betalactámicos y quinolonas fluoradas, frente a *Pseudomonas aeruginosa* y frente a otros microorganismos^{189,191,193,194,196,198,199}.

A la vista de todo lo expuesto, nosotros creemos que la fosfomicina puede ser una alternativa válida a considerar para el tratamiento empírico o etiológico, si se comprueba la existencia de una

cepa sensible, de la osteomielitis por *P. aeruginosa*, si bien nos parece más prudente su uso en asociación que en régimen de monoterapia, a pesar del buen resultado obtenido en nuestro modelo experimental.

Así pues, disponemos de una comprobación experimental del beneficioso efecto que tiene o puede tener la fosfomicina para el tratamiento de osteomielitis por *Pseudomonas aeruginosa*, pero ¿hay algún estudio clínico que apoye esta idea? En las osteomielitis tratadas con fosfomicina, son escasos los aislamientos de Gram negativos en general y de *P. aeruginosa* en particular. Así, en la serie de Fernández-Valencia y cols.²⁰², de 51 aislamientos sólo 5 corresponden a este microorganismo. Guggenbichler y cols.²⁰⁶, no encuentran ninguna en sus 30 enfermos. Roth y cols.²⁰⁸ sólo aíslan 20 sobre un total de 130 bacterias. Marget y Lohse²⁴¹ tratan 8 osteomielitis, pero no especifican los agentes causales en el trabajo publicado. Potel y Baron²⁰⁹ obtienen dos *Pseudomonas* de un total de 26 microorganismos aislados. Guerrero²⁵ encuentra una entre 51 bacterias. Finalmente, Meißner y cols.²¹⁰ aíslan 81 cepas, correspondiendo 10 a *P. aeruginosa*. En muchos de estos casos, el Gram negativo se encontró formando parte de una infección polimicrobiana, y no se especifica el grado de eficacia del tratamiento en los enfermos en los que se aisló, amén de que en algunas de estas series el tratamiento fue combinado en parte o en todos los pacientes.

Por otra parte, en procesos diferentes de osteomielitis, fosfomicina se ha utilizado muy poco frente a *P. aeruginosa*. Podemos destacar el estudio de Meyer¹⁷⁸, que la utiliza sola o en combinación en 86 pacientes con fibrosis quística, en los que se aislaron diferentes microorganismos, incluida *P. aeruginosa*. Curiosamente, el grado de resistencia “in vitro” de las cepas que obtuvo de este bacilo fue elevado, y

sin embargo la respuesta clínica fue favorable, tanto en monoterapia como en tratamiento combinado, en un 79'8% de los casos. Una de las posibles explicaciones que plantea es que podían estar presentes, aunque no se detectaran, otras bacterias diferentes de *P. aeruginosa* sensibles a la acción de la fosfomicina.

En otras enfermedades graves, tales como endocarditis, sepsis, meningitis o neumonía, también ha sido utilizada, sola o en asociación que ha sido lo más habitual, pero generalmente frente a estafilococos u otros microorganismos diferentes de *P. aeruginosa*^{194,197,201,241-247}, aunque en algunos de estos estudios se detectaron cepas de esta bacteria pero en escaso número^{243,244,247}.

Por lo tanto, es evidente, desde nuestro punto de vista, que la fosfomicina puede ser de utilidad frente a *P. aeruginosa*, pero consideramos necesario corroborar los buenos resultados experimentales con trabajos clínicos adecuados, dado su poco empleo hasta la actualidad.

Fosfomicina trometamol, recientemente comercializada en España, ha sido promocionado como un antimicrobiano cuyas características farmacocinéticas lo hacen especialmente indicado para el tratamiento a dosis única por vía oral de las infecciones no complicadas de las vías urinarias, pues consigue una elevada y prolongada concentración en la orina (picos de 2000-3000 mcg./ml.) tras la administración oral de 2-3 g. de fosfomicina base¹⁷³. Su circulación enterohepática explica esta elevada concentración urinaria, mantenida hasta 48 horas después de la toma de una dosis, así como la existencia de "picos" séricos secundarios tras la concentración máxima alcanzada 2-3 horas tras su administración^{248,249}. Su biodisponibilidad y niveles séricos, duplican al menos los alcanzados por la

sal cálcica de fosfomicina²⁴⁹, llegando a triplicarlos o cuadruplicarlos en algunos estudios²⁴⁸.

Al no disponer de ninguna referencia acerca del uso de fosfomicina trometamol a largo plazo, incluso tras una búsqueda bibliográfica (base de datos MEDLINE), contactamos con los laboratorios fabricantes solicitando tales estudios si existían. La respuesta que obtuvimos fue que el tratamiento a largo plazo con este producto ni siquiera se había planteado, por el riesgo de efectos secundarios, especialmente gastrointestinales. Ciertamente se ha comprobado que dosis de 5 gramos presentan una disminución de la excreción urinaria respecto a dosis menores, por lo que se ha postulado que la causa sea una disminución de la absorción por el tracto digestivo, que “se satura” cuando la dosis oral supera los 3 gramos^{21,250}. Pero, dado que la concentración máxima se alcanza en 2-3 horas, la absorción es relativamente rápida, por lo que la administración cada 6 a 8 horas no tendría por qué provocar esta saturación. Si con 2 gramos cada 12 horas se logra un nivel mantenido de 24 mcg./ml.²⁴, tal vez con 2 gramos cada 6-8 horas se lograra un buen nivel constante, del orden del 50% del que se obtiene vía im, al igual que una sola dosis oral logra una concentración máxima del 50% de la im²¹. Además, en el propio “dossier” del producto²⁵¹, facilitado por uno de los laboratorios fabricantes, se informa, sin cita bibliográfica, de estudios a largo plazo realizados en animales con resultados satisfactorios. En un grupo de ratas a las que se administraron dosis de 250, 1000 y 4000 mg./kg./día, durante 12 semanas, sólo observaron una ligera reducción del consumo de comida durante la primera semana y la aparición de heces diarreicas con la dosis más elevada; estos efectos desaparecieron en las siguientes semanas. En perros, administraron el fármaco durante 26

semanas, a dosis de 100, 300 y 1000 mg./kg./día, sin que se observaran fenómenos tóxicos, salvo algún episodio aislado de diarrea, principalmente en la primera semana de tratamiento.

También se nos informó que se consideraba que podía ser peligrosa su administración continuada por la trometamina presente en la molécula, dado que ésta es un tampón sintético indicado para uso a muy corto plazo¹⁷⁴. Sin embargo, existe un producto, ketorolaco trometamol, comercializado en España a finales de 1991, que es un antiinflamatorio no esteroideo con formulación oral y parenteral, aprobado para el tratamiento del dolor a corto-medio plazo. Con este fármaco se han descrito efectos secundarios graves, como hemorragia digestiva, insuficiencia renal aguda y shock anafiláctico, pero atribuidos al ketorolaco y superponibles a los de los demás antiinflamatorios²⁵²⁻²⁵⁶.

Consideramos que, efectivamente, fosfomicina trometamol está especialmente indicada en infecciones del tracto urinario, por las elevadas y persistentes concentraciones que alcanza en dicha zona. Sin embargo, creemos que, a la vista de los niveles séricos que se obtienen, a caballo entre la sal cálcica oral y la sal sódica intramuscular, podría ser útil realizar estudios encaminados a su utilización durante tiempos más prolongados y para otras infecciones diferentes de las urinarias. Fernández-Valencia y cols.²⁰² utilizaron la sal cálcica de fosfomicina en monoterapia para algunos casos de osteomielitis por *S. aureus*, y obtuvieron buenos resultados. Hernández²⁰⁷ demostró su eficacia profiláctica en fracturas y cirugía ósea, utilizando la vía parenteral y oral combinadas. A pesar de ésto, estamos de acuerdo con los autores que consideran la fosfomicina cálcica inadecuada para el tratamiento de la osteomielitis, dados los bajos niveles séricos que se alcanzan^{21,22,171,179}. Precisamente por ello, nos

parece que podría ser interesante estudiar esta sal de trometamina para su uso a corto-medio plazo, pues podría abrir la puerta al uso de fosfomicina en terapia secuencial, parenteral-oral, para infecciones óseas y de otros territorios.

5.3.- NIVELES OSEOS Y SERICOS DE FOSFOMICINA

En el caso de los antibióticos, a diferencia de algunos otros fármacos, la farmacocinética tiene indudable utilidad, dado que la actividad de un antimicrobiano sólo se consigue cuando se alcanza en la propia bacteria una concentración superior a la precisa para inhibir su crecimiento²⁵⁷. Dicho de otra manera, no basta que el antibiótico sea activo “in vitro”, sino que además ha de serlo “in vivo”. La farmacocinética también orienta, a través del conocimiento de la vida media de eliminación (hemivida), con respecto al intervalo de administración, teniendo en cuenta la relación entre la concentración plasmática y la CMI del microorganismo a tratar²⁵⁷. En general, se considera que lo más razonable es intentar mantener el nivel del agente terapéutico por encima de la CMI durante todo el intervalo entre dosis²⁵⁸. Sin embargo, los cada vez más extendidos estudios sobre el efecto postantibiótico, abren la posibilidad de un mayor espaciamiento entre las dosis, aunque entre cada administración del antimicrobiano el nivel sérico caiga por debajo de la CMI²⁵⁹.

Por otro lado, se admite en la actualidad la relevancia de los estudios farmacocinéticos en animales, de tal manera que un análisis correcto de los datos obtenidos proporciona estimadas razonables de los parámetros cinéticos del antibiótico en el ser humano, siendo esta extrapolación más válida cuando la eliminación sigue una cinética lineal²⁶⁰.

El tratamiento antimicrobiano de la osteomielitis se debe fundamentar por tanto en datos microbiológicos y farmacológicos: especie bacteriana y su sensibilidad a los antibacterianos, y concentraciones alcanzadas por éstos en el lugar de la infección, o mejor dicho, capacidad

de actuación en el lugar de la infección. Así pues, para intentar predecir el éxito del tratamiento en la infección ósea, habrá que utilizar los niveles séricos y óseos del antimicrobiano en cuestión^{2,10}.

En la concentración del antibiótico o quimioterápico en el hueso, influyen una serie de variables muy diversas¹⁰:

1.- Factores del hueso:

- Vascularización.
- Histología ósea y patología que la altere.
- Tipo de hueso.
- Enfermedades concomitantes.

2.- Factores del antimicrobiano:

- Farmacocinética.
- Histo especificidad.
- Vía de administración y dosificación.

3.- Técnica de estudio utilizada:

- Tipo de muestra y momento de la obtención.
- Preparación de la muestra.
- Contaminación hemática.
- Técnica de determinación de niveles.
- Estudio de la fracción unida al hueso.

Nosotros podemos manipular sólo algunos de estos factores. Así, los que dependen del hueso no son modificables en principio, pero sí los otros dos, al menos parcialmente. Respecto a los factores del antimicrobiano, su farmacocinética e histo especificidad, es decir su afinidad por un tejido determinado, son constantes, pero con un estudio adecuado de las mismas podremos utilizar la dosificación y vía de administración más adecuadas.

Para la determinación de niveles, de los que obtenemos los datos farmacocinéticos y de histoespecificidad, los métodos más utilizados son los microbiológicos por difusión y los de cromatografía líquida de alta presión. El primero tiene varias limitaciones, como es que el sobrenadante resultante de la homogeneización del triturado óseo sea más viscoso que el suero diluido, con lo que no difunden igual en el agar, siendo los resultados obtenidos no comparables, ni siquiera para concentraciones similares; además, si los niveles séricos e hísticos son muy diferentes, no se puede utilizar la misma cepa bacteriana para su determinación, sino dos con distinta sensibilidad, introduciendo un factor diferencial en los resultados. El método de cromatografía suele ser más sensible y reproducible, pero tiene un coste superior; por otro lado, determina concentraciones del antimicrobiano y sus metabolitos por separado, sin tener en cuenta la actividad antibacteriana de los mismos, cosa que sí ocurre con el método microbiológico¹⁰. Por ello, no es extraño que en algún trabajo donde se han empleado ambos métodos simultáneamente, los resultados sean dispares⁸⁹.

Casi todos los autores que han publicado trabajos sobre concentraciones óseas de antimicrobianos, han utilizado el método microbiológico de difusión en agar, al menos en los estudios experimentales^{26,85-88,106,125,151,162-164,166,215,226,229}. Sin embargo, se admite que la técnica es problemática.

En estudios en clínica humana, se han utilizado ambos métodos, el microbiológico^{89,202,210,261-265} y el de cromatografía líquida de alta presión^{89,266,267}.

Otros autores han empleado métodos isotópicos²⁶⁸.

En nuestro trabajo, llevamos a cabo la medición de los niveles de fosfomicina alcanzados en hueso sano e infectado de ratas “Wistar”, tras administrar 200 mg. subcutáneos cada 12 horas durante 7 días, así como las concentraciones séricas tras una sola dosis igualmente subcutánea. Empleamos el método microbiológico por razones de economía y disponibilidad técnica fundamentalmente; además, nos interesaba conocer la concentración efectiva, con actividad antimicrobiana, de fosfomicina en el foco óseo.

A partir de la curva de concentración sérica obtuvimos una serie de parámetros farmacocinéticos del antibiótico (concentración máxima, tiempo máximo, hemivida, área bajo la curva y constante de eliminación).

En el suero el “pico” se obtuvo a los 30 minutos de la inyección, con un valor medio de 700 mcg./ml., con un tiempo máximo de 30 minutos y una constante de eliminación de $0'58 \text{ h}^{-1}$. La hemivida calculada fue de 1'19 horas. El área bajo la curva desde 0 a 10 horas fue de 1384'64 (mcg./ml.)h., y desde 0 a infinito de 1390'16 (mcg./ml.)h.

Los valores obtenidos experimentalmente presentaron un buen ajuste con la recta de regresión semilogarítmica, indicativo de una cinética lineal adecuada, extremo éste ya comprobado en otros trabajos experimentales en conejos^{269,270}. Como ya se ha comentado, este tipo de cinética de eliminación es más extrapolable al ser humano²⁶⁰.

Las concentraciones óseas máximas obtenidas fueron de 112'4 mcg./g. de hueso sano, y 185'8 mcg./g. de hueso enfermo. En el “valle”, las concentraciones fueron de 9'435 mcg./g. y 14'480 mcg./g., respectivamente.

Estos resultados son similares a los descritos por otros autores^{26,215,262}.

En nuestro análisis de los resultados, no hemos comparado las concentraciones séricas con las determinadas en hueso, porque éstas se obtuvieron tras 7 días de tratamiento, y aquéllas tras la administración de una dosis única, por lo que dudamos de la validez de esta comparación. Sin embargo, Norden⁸⁸ en 1985 estudió estas concentraciones en animales tratados durante 3 días y en otros a los que se administró una sola dosis de antimicrobiano (ciprofloxacino y tobramicina), obteniendo resultados muy similares y comparables entre ambos.

En cualquier caso, los valores obtenidos por nosotros se correlacionan bien con la eficacia de la fosfomicina demostrada en nuestro modelo, pues la concentración del antibiótico en el hueso se mantuvo siempre por encima de la CMI de la cepa ensayada. En algunos trabajos, esta correlación de la concentración ósea de un antimicrobiano con su eficacia real no se ha observado²⁷¹.

Por otro lado, las diferencias obtenidas entre hueso sano y enfermo presentaron significación estadística. Esto es un dato cuando menos curioso, descrito ya en los primeros modelos de osteomielitis. Efectivamente, en los primeros estudios de niveles de antimicrobianos en hueso sano e infectado¹⁶², ya se comprobó una mayor concentración de cefalotina y lincomicina en hueso enfermo. Los autores, Norden y Kennedy, plantearon que podía deberse a restos hemáticos. Pero, tras calcular la cantidad de sangre presente en el hueso sano y con osteomielitis, éste presentó mayor cantidad, mas en una cuantía despreciable como factor influyente, en función del nivel sérico de los antibióticos. Además, cefalotina tuvo niveles séricos mucho más altos que lincomicina, y sin embargo su concentración ósea en relación a la sérica fue 10 veces menor que la de lincomicina.

En otros trabajos posteriores, se repitió esta diferencia, observándose con cefaloridina¹⁶³, rifampicina¹⁰⁶, gentamicina¹⁰⁶, sisomicina^{106,125}, carbenicilina¹²⁵, cefalotina^{106,229} y cefamandol²²⁹.

Mader y Wilson²²⁹ en 1983, plantearon la misma cuestión que habían planteado en 1971 Norden y Kennedy, pero en esta ocasión, realizando estudios de perfusión en ambos huesos, obtuvieron menor flujo en el hueso enfermo que en el sano.

Como nota discrepante, podemos citar los trabajos de Henry y cols.⁸⁶ en 1985, que encontraron mayores concentraciones de ciprofloxacino y especialmente de vancomicina en el hueso sano comparado con el enfermo; para rifampicina, las concentraciones fueron similares en ambos huesos.

Así pues, ésta es una de las cuestiones, relacionadas con los estudios farmacocinéticos en modelos experimentales de osteomielitis, que quedan pendientes de resolución.

Otro trabajo realizado para estudiar la farmacocinética de la fosfomicina en el animal de experimentación, es el de Olay y cols.²⁶ en 1983. Estos autores hallaron las concentraciones del fármaco en suero y hueso infectado por *S. aureus* en conejos blancos “Nueva Zelanda”, tras administrar 50 mg./kg. subcutáneos durante 3 días. Utilizaron el método microbiológico. Obtuvieron el “pico” sérico a los 30 minutos, y en hueso al cabo de una hora de su administración. La difusión de la fosfomicina, respecto al pico sérico, a médula, esponjosa y cortical, fue del 31%, 28% y 10%, respectivamente. Los niveles óseos alcanzados fueron también superiores a la CMI respecto al microorganismo infectante.

Wittmann²⁶² midió en el hombre la concentración de diferentes antimicrobianos en hueso, entre ellos la fosfomicina. Observó que ésta

alcanzaba elevadas concentraciones óseas comparándola con el resto de los fármacos estudiados (cefuroxima, cefoxitina, cefalexina, cefotaxima, oxacilina, azlocilina, mezlocilina y piperacilina), lo que atribuyó a la similar estructura química que existe entre este antibiótico y la hidroxiapatita, lo cual facilitaría la difusión a la porción inorgánica del hueso.

Vicente y cols.²⁷² estudiaron la difusión de fosfomicina a fluidos intersticiales en perros, comparándola con la de cloxacilina, ampicilina y carbenicilina. Obtuvieron mejores resultados con fosfomicina, lo que relacionaron con su escasa, casi nula, unión a proteínas, así como con su bajo peso molecular. Posteriormente repitieron el estudio en conejos²⁷³, comparando en esta ocasión fosfomicina, ampicilina, cloxacilina, carbenicilina, cefalotina, cefaloridina y cefoxitina. Observaron una relación inversa entre difusión a fluidos intersticiales y peso molecular así como unión a proteínas, logrando los mejores resultados con fosfomicina, comparando con los otros antimicrobianos.

En el hombre, Sirot y cols²⁷⁴ estudiaron la concentración de fosfomicina en suero, hueso esponjoso y cortical ósea, comprobando una buena difusión al hueso, decreciendo las concentraciones tisulares paralelamente a las séricas, aunque los niveles obtenidos en la cortical disminuyeron más lentamente que en el hueso esponjoso y en el suero, sugiriendo un cierto grado de fijación en ese territorio.

En resumen, podemos afirmar que en nuestro trabajo se ha comprobado una adecuada cinética sérica y ósea de fosfomicina, acorde con los resultados obtenidos en el modelo experimental tratado con este antimicrobiano, y con los estudios realizados por otros autores.

6.- CONCLUSIONES

1.- El modelo desarrollado muestra la implicación real y el poder patógeno de *Pseudomonas aeruginosa* en la infección ósea.

2.- El modelo desarrollado es válido para realizar ensayos terapéuticos con antimicrobianos en la osteomielitis crónica.

3.- Fosfomicina alcanza concentraciones óseas adecuadas, más elevadas en hueso enfermo, en la rata con osteomielitis crónica.

4.- Fosfomicina presenta una farmacocinética experimental sérica y ósea que permite plantear su utilización para el tratamiento de osteomielitis.

5.- Hemos comprobado la eficacia de fosfomicina en el tratamiento de la osteomielitis crónica por *Pseudomonas aeruginosa* en la rata.

6.- Consideramos que fosfomicina es una alternativa terapéutica útil para el tratamiento de la osteomielitis por *Pseudomonas aeruginosa*, si bien se requieren ensayos clínicos que confirmen los resultados experimentales.

7.- No se han encontrado diferencias significativas entre las pautas de 14 y 28 días de duración del tratamiento. Se requieren más estudios para confirmar la eficacia de pautas cortas en el tratamiento de osteomielitis.

7.- BIBLIOGRAFIA

1. Norden, C.W.: Osteomielitis. En: Enfermedades Infecciosas. Principios y práctica (Edición en Español). Mandell, G.L.; Douglas, R.G.; Bennet, J.E. Ed. Panamericana. 3ª ed. Buenos Aires. 1991; 972-980.
2. Waldvogel, F.A.; Vasey, H.: Osteomyelitis: the past decade. N.Engl.J.Med. 1980; 303: 360-370.
3. Gomis, M.: Osteomielitis. En: Medicina Interna. Farreras, P.; Rozman, C. Ed. Doyma. 12ª ed. Barcelona. 1992; 1104-1107.
4. Guerrero, A.: Osteomielitis. En: Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Vol. 1. Perea, E.J. Ed. Doyma. Barcelona. 1992; 482-490.
5. Gomis, M.; Herranz, A.; Aparicio, P.; Fe, A.; Menéndez, A.; Pastor, J.: Osteomielitis por *Pseudomonas aeruginosa*. II Congreso de la Sociedad Madrid-Castilla La Mancha de Medicina Interna. Talavera de la Reina. 1989. Anales de Medicina Interna. 1989; 6(Supl.II): 30.
6. Gomis, M.; Herranz, A.; Balcabao, I.P.; Moreno, F.; Sánchez, S.; Pastor J.: Ceftazidima en el tratamiento de osteomielitis. Rev.Esp.Microbiol.Clin. 1986; 1: 303-310.
7. Garau, J.: Importancia clínica de la producción de betalactamasa cromosómica inducible por algunas especies de bacilos gramnegativos de interés nosocomial. En: Betalactamasas. Su importancia para el clínico. Gómez-Lus, R.; Garau, J. S.K.F.S.A.E. Madrid. 1992; 179-191.
8. Gómez-Lus, R.; Gil, J.; Castillo, J.; Rubio, M.C.: Impacto de los inhibidores de betalactamasas en la susceptibilidad antibiótica de los patógenos más frecuentes. En: Betalactamasas. Su importancia para el clínico. Gómez-Lus, R.; Garau, J. S.K.F.S.A.E. Madrid. 1992; 109-127.

9. Weiss, M.E.; Adkinson, N.F.: Alergia a los β -lactámicos. En: Enfermedades Infecciosas. Principios y práctica. (Edición en Español). Mandell, G.L.; Douglas, R.G.; Bennet, J.E. Ed. Panamericana. 3^a ed. Buenos Aires. 1991; 275-280.
10. Perea, E.J.; Iturrate, C.; Borrás, A.; García, M.C.: Distribución ósea de antimicrobianos. *Enf.Infec.Microbiol.Clin.* 1987; 5: 553-558.
11. Bouza, E.: Antibioterapia sistémica en osteomielitis. *Enf.Infec.Microbiol.Clin.* 1987; 5: 568-575.
12. Ball, P.: Emergent resistance to ciprofloxacin amongst *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*: clinical significance and therapeutic approaches. *J.Antimicrob.Chemother.* 1990; 26(Suppl F): 165-179.
13. Cogollos, R.; Alós, J.I.; Gómez-Garcés, J.L.: Evolución de la sensibilidad a fluorquinolonas en *Staphylococcus aureus* aislados de hemocultivos en un hospital general. *Enf.Infec.Microbiol.Clin.* 1993; 11: 460.
14. Rodríguez Creixems, M.: Evolución de la resistencia a antimicrobianos de *Staphylococcus* aislados en hospitales españoles. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* 1992; 10(Supl. 3): 24-29.
15. Schlüter, G.: Ciprofloxacin: review of potential toxicologic effects. *Am.J.Med.* 1987; 82(Suppl. 4A): 91-93.
16. Parra, A.; Gómez, J.: Patrones de cambio en el uso de antibióticos en hospitales: bases y nuevas perspectivas. *Med.Clin.* 1994; 102: 25-29.
17. Mader, J.T.: Animal models of osteomyelitis. *Am.J.Med.* 1985; 78(Suppl 6B): 213-217.

18. Gomis, M.; Barberán, J.; Ramón, J.; Corrales, I.: Modelos experimentales de osteomielitis. *Rev.Esp.Quimioterap.* 1993; 6: 193-197.
19. Gomis, M.; Fe, M.; Herranz, A.; Aparicio, P.; Alonso, M.J.; Martínez, T.: Terapéutica de osteomielitis por bacilos gramnegativos. Modelo experimental en ratas. *Rev.Esp.Quimioterap.* 1989; 2: 254-259.
20. Vargas, E.; Pacheco, E.; Beneit, J.A.: Antibióticos (V): Misceláneos: Fosfomicina. En: *Farmacología y su proyección a la clínica.* Velázquez, B. L. Ed. Oteo. 15ª ed. Madrid. 1987; 840-841.
21. Dámaso, D.; Moreno-López, M.; Daza, R.M.: Antibióticos y Quimioterápicos Antibacterianos. Uso Clínico. Ed. Marketing Pharm, S.A. Madrid. 1984 (Edición revisada en 1990).
22. Gómez, J.; Ruiz, J.; Herrero, F.; Molina, M.; Baños, V.; Valdés, M.: Elección razonada del uso de antibióticos en la práctica clínica. *Enf.Infec.Microbiol.Clin.* 1993; 11: 214-220.
23. Mensa, J.; Gatell, J.M.; Corachán, M.; Escofet, M.C.; Martínez, J.A.; Zamora, L.: Guía de Terapéutica Antimicrobiana. Eds. Científicas y Técnicas, S.A. 4ª ed. Barcelona. 1994.
24. Simon, C.; Stille, W.; Perea, E.J.: Manual de Terapéutica Antimicrobiana. Salvat Editores, S.A. Barcelona. 1987.
25. Guerrero, A.: Osteomielitis: Estudio clínico y experimental. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. 1987.
26. Olay, T.; Vicente, M.V.; Saraza, M.; Rodríguez, A.: Experimental *Staphylococcus aureus* osteomyelitis treated with fosfomicin and cephazolin: Single and combined therapy. *Drugs Exptl.Clin.Res.* 1983; 9: 55-59.
27. Baquero, F.: Adhesividad bacteriana e infección ósea. *Enf.Infec.Microbiol.Clin.* 1987; 5: 514-516.

28. Gristina, A.G.; Barth, E.; Webb, L.X.: Microbial adhesion and the pathogenesis of biomaterial-centered infections. En: Orthopaedic Infection. Gustilo, R.B. Saunders Company. Philadelphia. 1989; 3-25.

29. Mayberry-Carson, K.J.; Tober-Meyer, B.; Smith, K.J.; Lambe, D.W.Jr.; Costerton, J.W.: Bacterial adherence and glycocalyx formation in osteomyelitis experimentally induced with *Staphylococcus aureus*. Infect.Immun. 1984; 43: 825-833.

30. Gristina, A.G.; Oga, M.; Webb, L.X.; Hobgood, C.D.: Adherent bacterial colonization in the pathogenesis of osteomyelitis. Science. 1985; 228: 990-993.

31. Alam, S.I.; Khan, K.A.; Ahmad, A.: Glycocalyx positive bacteria isolated from chronic osteomyelitis and septic arthritis. Ceylon Med.J. 1990; 35: 21-23.

32. Waldvogel, F.A.; Medoff, G.; Swartz, M.N.: Osteomyelitis: a review of clinical features, therapeutics considerations and unusual aspects. (First of three parts). N.Engl.J.Med. 1970; 282: 198-206.

33. Waldvogel, F.A.; Medoff, G.; Swartz, M.N.: Osteomyelitis: a review of clinical features, therapeutics considerations and unusual aspects. (Second of three parts). N.Engl.J.Med. 1970; 282: 260-266.

34. Waldvogel, F.A.; Medoff, G.; Swartz, M.N.: Osteomyelitis: a review of clinical features, therapeutics considerations and unusual aspects. (Third of three parts). N.Engl.J.Med. 1970; 282: 316-322.

35. Gomis, M.: Situación actual de la osteomielitis. En: Avances en Medicina Interna-3. Sociedad Española de Medicina Interna. Ed. ELA S.L. Madrid. 1991; 101-113.

36. Gentry, L.O.: Approach to the patient with chronic osteomyelitis. En: Current clinical topics in infectious diseases 8.

Remington, J.S.; Swartz, M.N. McGraw-Hill Book Company. New York. 1987; 62-83.

37. Gómez, E.: Radiología de la infección ósea. *Enf.Infec.Microbiol.Clin.* 1987; 5: 525-530.

38. Martín, L.M.: La medicina nuclear en el diagnóstico de las infecciones del aparato locomotor. *Enf.Infec.Microbiol.Clin.* 1987; 5: 521-524.

39. Mackowiak, P.A.; Jones, S.R.; Smith, J.W.: Diagnostic value of sinus-tract cultures in chronic osteomyelitis. *J.A.M.A.* 1978; 239: 2772-2775.

40. Chandrasekar, P.H.; Narula, A.P.: Bone and joint infections in intravenous drug abusers. *Rev.Infect.Dis.* 1986; 8: 904-911.

41. Gentry, L.O.: Osteomyelitis: options for diagnosis and management. *J.Antimicrob.Chemother.* 1988; 21(Suppl. C): 115-128.

42. Guerrero, A.: Estudio etiológico de las osteomielitis bacterianas. *Enf.Infec.y Microbiol. Clin.* 1987; 5: 517-520.

43. Holzman, R.S.; Bishko, F.: Osteomyelitis in heroin addicts. *Ann.Inter.Med.* 1971; 75: 693-696.

44. Leonard, A.; Comty, C.M.; Shapiro, F.L.; Raji, L.: Osteomyelitis in hemodialysis patients. *Ann.Intern.Med.* 1973; 78: 651-658.

45. Muñoz, C.; Trujillo, G.; Latorre, C.; Juncosa, T.; Huet, R.: Infecciones osteoarticulares en niños. *Enf.Infec.Microbiol.Clin.* 1992; 10: 286-289.

46. Paya, C.V.; Wilson, W.R.; Fitzgerald, R.H.Jr.: Management of infection in total knee replacement. En: *Current Clinical Topics in Infectious Diseases*, 9. Remington, J.S.; Swartz, M.N. McGraw-Hill Book Company. New York. 1988; 222-240.

47. Dubey, L.; Krasinski, K.; Hernanz-Chulman, M.: Osteomyelitis secondary to trauma or infected contiguous soft tissue. *Pediatr.Infect.Dis.* 1988; 7: 26-34.
48. Gentry, L.O.: Role for newer beta-lactams antibiotics in treatment of osteomyelitis. *Am.J.Med.* 1985; 78(Suppl. 6A): 134-139.
49. Sapico, F.L.; Witte, J.L.; Canawati, H.N.; Montgomerie, J.Z.; Bessman, A.N.: The infected foot of the diabetic patient: quantitative microbiology and analysis of clinical features. *Rev.Infect.Dis.* 1984; 6(Suppl 1): S171-S176.
50. Brand, R.A.; Howard, B.: *Pseudomonas* osteomyelitis following puncture wounds in children. *J.Bone Joint Surg.* 1974; 56-A: 1637-1642.
51. Gale, D.W.; Scott, R.: Puncture wound of the foot? Persistent pain? Think of *Pseudomonas aeruginosa* osteomyelitis. *Injury.* 1991; 22: 427-428.
52. Inaba, A.S.; Zukin, D.D.; Perro, M.: An update on the evaluation and management of plantar puncture wounds and *Pseudomonas* osteomyelitis. *Pediatr.Emerg.Care.* 1992; 8: 38-44.
53. Wald, E.R.: Risk factors for osteomyelitis. *Am.J.Med.* 1985; 78(Suppl 6B): 206-212.
54. Bodey, G.P.; Bolivar, R.; Fainstein, V.; Jadeja, L.: Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev.Infect.Dis.* 1983; 5: 279-313.
55. Bamberger, D.M.; Daus, G.P.; Gerding, D.N.: Osteomyelitis in the feet of diabetic patients. *Am.J.Med.* 1987; 83: 653-660.

56. Lavery, L.A.; Harkless, L.B.; Felder-Johnson, A.; Mundine, S.: Bacterial pathogens in infected puncture wounds in adults with diabetes. *J.Foot Ankle Surg.* 1994; 33: 91-97.
57. Hall, B.B.; Fitzgerald, R.H.Jr.; Rosenblatt, J.E.: Anaerobic osteomyelitis. *J.Bone Joint Surg.* 1983; 65-A: 30-35.
58. Lewis, R.P.; Sutter, V.L.; Finegold, S.M.: Bone infections involving anaerobic bacteria. *Medicine.* 1978; 57: 279-305.
59. Nakata, M.M.; Lewis, R.P.: Anaerobic bacteria in bone and joint infections. *Rev.Infect.Dis.* 1984; 6(Suppl 1): S165-S170.
60. Johansson, A.; Svensson, O.; Blomgren, G.; Eliasson, G.; Nord, C.E.: Anaerobic osteomyelitis. A new experimental rabbit model. *Clin.Orthop.* 1991; 265: 297-301.
61. Lambe, D.W.; Ferguson, K.P.; Mayberry-Carson, K.J.; Tober-Meyer, B.; Costerton, J.W.: Foreign-body-associated experimental osteomyelitis induced with *Bacteroides fragilis* and *Staphylococcus epidermidis* in rabbits. *Clin.Orthop.* 1991; 266: 285-294.
62. Mayberry-Carson, K.J.; Tober-Meyer, B.; Lambe, D.W.Jr.; Costerton, J.W.: Osteomyelitis experimentally induced with *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Staphylococcus epidermidis*. Influence of a foreign-body implant. *Clin.Orthop.* 1992; 280: 289-299.
63. Pichichero, M.E.; Friesen, H.A.: Polimicrobial osteomyelitis: report of three cases and review of the literature. *Rev.Infect.Dis.* 1982; 4: 86-96.
64. Mader, J.T.; Cierny, G.: Osteomyelitis. En: New surgical and medical approaches in infectious diseases. Root, R.K.; Trunkey, D.D.; Sande, M.A. Churchill Livingstone. New York. 1987; 217-228.
65. Gomis, M.: ¿Pueden resolverse todas las osteomielitis sólo con tratamiento antibiótico? *Rev.Esp.Quimioterap.* 1989; 2: 303-307.

66. Fitzgerald, R.H.; Kelly, P.J.; Snyder, R.J.; Washington II J.A.: Penetration of methicillin, oxacillin and cephalotin into bone and synovial tissues. *Antimicrob.Agents Chemother.* 1978; 14: 723-726.
67. Sirot, J.; Lopitiaux, R.; Dumont, C.; Delisle, J.J.; Rampon, S.; Cluzel, R.: Diffusion de la cloxacilline dans le tissu osseux humain après administration par voie orale. *Pathol.Biol.* 1982; 30: 332-335.
68. Tetzlaff, T.R.; Howard, J.B.; MaC Cracker, G.H.; Calderón, E.; Larrondo, J.: Antibiotic concentration in pus and bone of children with osteomyelitis. *J.Pediatr.* 1978; 92: 135-140.
69. Wilber, R.B.: Beta-lactam therapy of osteomyelitis and septic arthritis. *Scand.J.Infect.Dis.* 1984; 42: 155-168.
70. Gomis, M.; Herranz, A.; Aparicio, P.; Filloy, J.L.; Pastor, J.: Cefotaxime treatment of chronic osteomyelitis caused by gram-negative bacilli. 16th International Congress of Chemotherapy. Jerusalem. 1989; Abstract book: 152.
71. Gomis, M.; Herranz, A.; Barberán, J.; Pastor, J.M.: Cefotaxime in the treatment of osteomyelitis in diabetic fetid food. 17th International Congress of Chemotherapy. Berlín. 1991; Abstract nº 1029.
72. Gomis, M.; Herranz, A.; Fe, A.; Aparicio, P.; Alguacil, R.; Mato, R.; Pastor, J.M.: Ceftriaxona en el tratamiento de las osteomielitis en el pie del diabético. *Rev.Esp.Quimioterap.* 1990; 3: 283-293.
73. Gomis, M.; Herranz, A.; Menéndez, M.A.; Barberán, J.; Pastor, J.M.: Piperacillin in the treatment of osteomyelitis and soft tissue infections. 17th International Congress of Chemotherapy. Berlín. 1991; Abstract nº 1030.
74. Gomis, M.; Pastor, J.; Herranz, A.; Aparicio, P.; Fe, A.; Alguacil, R.: Ceftriaxone in foot infections in diabetic patients.

International Congress for Infectious Diseases. Río de Janeiro. 1988; Abstract nº 441.

75. Gomis, M.: Tratamiento de las osteomielitis con cefotaxima. En: Cefotaxima: Diez años de progreso en el tratamiento y prevención de infecciones hospitalarias. García Rodríguez J.A. Ed. J.R.Prous S.A. Barcelona. 1990; 75-86.

76. LeFrock, J.; Mader, J.; Smith, B.; Carr, B.: Bone and joint infections caused by gram-positive bacteria: treatment with cefotaxime. *Infection*. 1985; 13(Suppl. 1): S51-S55.

77. Norden, C.W.; Budinsky, A.: Treatment of experimental chronic osteomyelitis due to *Staphylococcus aureus* with ampicillin/sulbactam. *J.Infect.Dis.* 1990; 161: 52-53.

78. Simons, W.J.; Lee, T.J.: Aztreonam in the treatment of bone and joint infections caused by gram-negative bacilli. *Rev.Infect.Dis.* 1985; 7(Suppl 4): S783-S788.

79. MacGregor, R.R.; Gentry, L.O.: Imipenem/cilastatin in the treatment of osteomyelitis. *Am.J.Med.* 1985; 78(Suppl. 6A): 100-103.

80. Herranz, A.; Gomis, M.; Aparicio, P.; Fe, A.; Alonso, M.J.; Martínez, T.; Prieto, J. Osteomielitis experimental por *Pseudomonas aeruginosa*: tratamiento con Imipenem. I Congreso Ibérico de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Funchal (Madeira). 1989. Abstract nº 112.

81. Pérez, J.E.; Domínguez, J.; Rodríguez, A.: Imipenem en el tratamiento de las osteomielitis y osteoartritis severas. *Enf.Infec.Microbiol.Clin.* 1992; 10(Supl. 1): 22-24.

82. Waldvogel, F.A.: Use of quinolones for the treatment of osteomyelitis and septic arthritis. *Rev.Infect.Dis.* 1989; 11(Suppl. 5): S1259-S1263.

83. Parry, M.F.; Panzer, K.B.; Yukna, M.E.: Quinolone resistance. Susceptibility data from a 300-bed community hospital. *Am.J.Med.* 1989; 87(Suppl. 5A): 12-16.

84. De la Torre, F.; Suárez, A.; Pérez-Cecilia, E.; Gómez, M.; Picazo, J.J.: Sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* a ciprofloxacino, norfloxacino, ofloxacino, fleroxacino y ácido pipemídico. *Rev.Esp.Quimioterap.* 1991; 4: 161-163.

85. Henry, N.K.; Rouse, M.S.; Whitesell, A.L.; McConnell, M.E.; Wilson, W.R.: Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* experimental osteomyelitis with ciprofloxacin or vancomycin alone or in combination with rifampin. *Am.J.Med.* 1987; 82(Suppl. 4A): 73-75.

86. Henry, N.K.; Rouse, M.S.; Wilson, W.R.: The efficacy of ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus* experimental osteomyelitis. First International Ciprofloxacin Workshop. Leverkusen. 1985. *Excerpta Medica.* 1986; 95-99.

87. Norden, C.W.; Niederriter, K.: Ofloxacin therapy for experimental osteomyelitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Infect.Dis.* 1987; 155: 823-825.

88. Norden, C.W.; Shinnars, E.: Ciprofloxacin as therapy for experimental osteomyelitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Infect.Dis.* 1985; 151: 291-294.

89. Dellamonica, P.; Bernard, E.; Etesse, H.; Garraffo, R.: The diffusion of pefloxacin into bone and the treatment of osteomyelitis. *J.Antimicrob.Chemother.* 1986; 17(Suppl. B): 93-102.

90. Dellamonica, P.; Bernard, E.; Etesse, H.; Garraffo, R.; Drugeon, H.B.: Evaluation of pefloxacin, ofloxacin and ciprofloxacin in the treatment of thirty-nine cases of chronic osteomyelitis. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 1989; 8:1024-1030.

91. Gilbert, D.N.; Tice, A.D.; Marsh, P.K.; Craven, P.C.; Preheim, L.C.: Oral ciprofloxacin therapy for chronic contiguous osteomyelitis caused by aerobic gram-negative bacilli. *Am.J.Med.* 1987; 82(Suppl 4A): 254-258.
92. Gomis, M.; Barberán, J.; López-Arceo, J.; Herranz, A.; Pastor, J.M.: Pefloxacino en el tratamiento de la osteomielitis. *Rev.Esp.Quimioterap.* 1993; 6: 40-45.
93. Green, S.L.: Efficacy of oral fleroxacin in bone and joint infections. *Am.J.Med.* 1993; 94(Suppl. 3A): 174-176.
94. Greenberg, R.N.; Tice, A.D.; Marsh, P.K.; Craven, P.C.; Reilly, P.M.; Bollinger, M.; Weinanadt, W.J.: Randomized trial of ciprofloxacin compared with other antimicrobial therapy in the treatment of osteomyelitis. *Am.J.Med.* 1987; 82(Suppl. 4A): 266-269.
95. Hessen, M.T.; Ingerman, M.J.; Kaufman, D.H.; Weiner, P.; Santoro, J.; Korzeniowski, O.M.; Boscia, J.; Topiel, M.; Bush, L.M.; Kaye, D.; Levison, M.E.: Clinical efficacy of ciprofloxacin therapy for gram-negative bacillary osteomyelitis. *Am.J.Med.* 1987; 82(Suppl 4A): 262-265.
96. Lesse, A.J.; Freer, C.; Salata, R.A.; Francis, J.B.; Scheld, W.M.: Oral ciprofloxacin therapy for gram-negative bacillary osteomyelitis. *Am.J.Med.* 1987; 82(Suppl. 4A): 247-253.
97. López, J.C.; Cercenado, E.; Rodríguez-Creixems, M.; Romero, J.; García de la Torre, M.; Bouza, E.: Evaluación de la ciprofloxacina en el tratamiento de infecciones bacterianas graves. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* 1989; 7: 23-28.
98. Nix, D.E.; Cumbo, T.J.; Kuritzky, P.; Devito, J.M.; Schentag, J.J.: Oral ciprofloxacin in the treatment of serious soft tissue and bone infections: efficacy, safety, and pharmacokinetics. *Am.J.Med.* 1987; 82(Suppl. 4A): 146-153.

99. Slama, T.G.; Misinski, J.; Sklars, S.: Oral ciprofloxacin therapy for osteomyelitis caused by aerobic gram-negative bacilli. *Am.J.Med.* 1987; 82(Suppl 4A): 259-261.
100. Mouton, Y.: Eficacia clínica y tolerancia de ofloxacino. *Rev.Esp.Quimioterap.* 1994. 7(Supl. 2): 15-18.
101. Norden, C.W.; Shaffer, M.: Treatment of experimental chronic osteomyelitis due to *Staphylococcus aureus* with vancomycin and rifampin. *J.Infect.Dis.* 1983; 147: 352-357.
102. Wilson, K.J.; Mader, J.T.: Concentrations of vancomycin in bone and serum of normal rabbits and those with osteomyelitis. *Antimicrob.Agents Chemother.* 1984; 25:140-141.
103. Gomis, M.; Barberán, J.; López-Arceo, J.; Pastor, J.M.; González, F.; Ruiz, J.: Teicoplanina en el tratamiento de la osteomielitis estafilocócica. V Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Barcelona. 1992. Abstract nº228.
104. Weinberg, W.G.: Safety and efficacy of teicoplanin for bone and joint infections: result of a community-based trial. *South Med.J.* 1993; 86: 891-897.
105. Wittke, R.R.: Teicoplanin in the treatment of infections of bone and joints. En: *Teicoplanin: Further European Experience*. Grüneberg, R.N. International Congress and Symposium Series. 1990; 156: 37-47.
106. Norden, C.W.: Experimental osteomyelitis IV. Therapeutic trials with rifampin alone and in combination with gentamicin, sisomicin and cephalotin. *J.Infect.Dis.* 1975; 132: 493-499.
107. Costerton, J.W.; Lambe, D.W.Jr.; Mayberry-Carson, K.J.; Tober-Meyer, B.: Cell wall alterations in staphylococci growing in situ in experimental osteomyelitis. *Can.J.Microbiol.* 1987; 33: 142-150.

108. Mayberry-Carson, K.J.; Mayberry, W.R.; Tober-Meyer, B.; Costerton, J.W.; Lambe, D.W.Jr.: An electron microscopic study of the effect of clindamycin on adherence of *Staphylococcus aureus* to bone surfaces. *Microbios*. 1986; 45: 21-32.

109. Rodríguez-Noriega, E.: Clindamycin in the treatment of skin and soft tissue and bone and joint infections. En: Clindamycin in the treatment of human infections. Zambrano, D. The Upjohn Company. Michigan. 1992; 8-1 - 8-28.

110. Klainer, A.S.: Clindamycin in the treatment of diabetic foot infections. En: Clindamycin in the treatment of human infections. Zambrano, D. The Upjohn Company. Michigan. 1992;9-1 - 9-16.

111. Zimelis, V.M.; Jackson, G.G.: Activity of aminoglycoside antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*: specificity and site of calcium and magnesium antagonism. *J.Infect.Dis.* 1973; 127: 663-669.

112. Prieto, J.; Gomis, M.; Fe, A.; Hernández, M.P.; Corrales, I.: Treatment of diabetic fetid foot with metronidazol: microbiological basis. International Congress for Infectious Diseases. Río de Janeiro. 1988; Abstract nº 440.

113. Bergan, T.: *Pseudomonas*. En: Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Perea, E.J. Ed. Doyma S.A. Barcelona. 1992; 664-670.

114. Piédrola-Angulo, G.: *Pseudomonas* y bacilos gramnegativos no fermentadores. En: Microbiología y Parasitología Médica. Pumarola, A.; Rodríguez-Torres, A.; García-Rodríguez, J.A.; Piédrola-Angulo, G. Salvat Editores, S.A. Barcelona. 1984; 446-453.

115. Gobernado, M.: Epidemiología y factores de patogenicidad de *Pseudomonas*. Mesa Redonda sobre Infecciones por *Pseudomonas*. VI

Congreso Nacional de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Valencia. 1994.

116. Martínez, L.: *Pseudomonas aeruginosa*: adherencia a superficies celulares y a biomateriales. *Enf.Infec.Microbiol.Clin.* 1988; 6: 284-286.

117. Baquero, F.: *Pseudomonas* y fibrosis quística. Mesa Redonda sobre Infecciones por *Pseudomonas*. VI Congreso Nacional de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Valencia. 1994.

118. Rodríguez-Avial, C.; Cabronero, M.C.; Martín, G.; Gómez-Lus, M.L.; Prieto, J.; Picazo, J.J.: Inducción y selección de mutantes resistentes a ceftazidima en *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev.Esp.Quimioterap.* 1990; 3: 171-175.

119. Tirado, M.; Hermida, M.; Reig, R.; Esteva, C.; Vidal, R.; Roy, C.: Resistencia por hiperproducción de betalactamasa cromosómica en *Pseudomonas aeruginosa*. *Enf.Infec.Microbiol.Clin.* 1989; 7: 530-534.

120. Poole, K.; Krebes, K.; McNally, C.; Neshat, S.: Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J.Bacteriol.* 1993; 175: 7363-7372.

121. Pollack, M.: *Pseudomonas aeruginosa*. En: *Enfermedades Infecciosas. Principios y práctica (Edición en Español)*. Mandell, G.L.; Douglas, R.G.; Bennet, J.E. Ed. Panamericana. 3ª ed. Buenos Aires. 1991; 1768-1788.

122. Morrison, A.J.Jr.; Wenzel, R.P.: Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev.Infect.Dis.* 1984; 6(Suppl. 3): S627-S642.

123. Martín, J.; Altés, J.; Reina, J.; Aguiló, R.; Riera, M.: Osteomielitis esternal primaria por *Pseudomonas aeruginosa* en adictos a drogas por vía intravenosa. *Enf.Infec.Microbiol.Clin.* 1992; 10: 179-180.

124. Joseph, W.S.; LeFrock, J.: Infections complicating puncture wounds of the foot. *J.Foot Surg.* 1987; 26: S30-S33.
125. Norden, C.W.; Keleti, E.: Experimental osteomyelitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Infect.Dis.* 1980; 141: 71-75.
126. Sabriá, M.: *Pseudomonas* e infección sistémica. Mesa Redonda sobre Infecciones por *Pseudomonas*. VI Congreso Nacional de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Valencia. 1994.
127. Norden, C.W.; Myerowitz, R.L.; Keleti, E.: Experimental osteomyelitis due to *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*: a radiographic-pathological correlative analysis. *Br.J.Exp.Path.* 1980; 61:451-460.
128. Conrad, D.A.; Williams, R.R.; Couchman, T.L.; Lentnek, A.L.: Efficacy of aztreonam in the treatment of skeletal infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev.Infect.Dis.* 1991; 13(Suppl. 7): S634-S639.
129. Dutoy, J.P.; Wauters, G.: The treatment of bone infections with ceftazidime. *J.Antimicrob.Chemother.* 1983; 12(Suppl. A): 229-233.
130. Nelson, D.R.; Buxton, T.B.; Luu, Q.N.; Rissing, J.P.: An antibiotic resistant experimental model of *Pseudomonas* osteomyelitis. *Infection.* 1990; 18: 246-248.
131. Rouse, M.S.; Tallan, B.M.; Henry, N.K.; Steckelberg, J.M. Wilson, W.R.: Animal models as predictor of outcome of therapy with broad spectrum cephalosporins. *J.Antimicrob.Chemother.* 1992; 29(Suppl A): 39-45.
132. Bayer, A.S.: Clinical utility of new quinolones in treatment of osteomyelitis and lower respiratory tract infections. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 1989; 8: 1102-1110.

133. Dan, M.; Siegman-Igra, Y.; Pitlik, S.; Raz, R.: Oral ciprofloxacin treatment of *Pseudomonas aeruginosa* osteomyelitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1990; 34: 849-852.

134. Desplaces, N.; Acar, J.F.: New quinolones in the treatment of joint and bone infections. *Rev.Infect.Dis.* 1988; 10(Suppl. 1): S179-S183.

135. Swedish Study Group: Therapy of acute and chronic gram-negative osteomyelitis with ciprofloxacin. *J.Antimicrob.Chemother.* 1988; 22: 221-228.

136. Bernard, E.; Dellamonica, P.; Etesse, H.; Garraffo, H.; Beziau, H.; Armengaud, F.; Lapalus, P.: Efficacy of ofloxacin and pefloxacin for the treatment of bone infections. *Rev.Infect.Dis.* 1988; 10(Suppl 1): S188-S189.

137. Vernet, V.; Remy, G.; Rouger, C.; Chippaux, C.: Clinical efficacy and bacteriologic activity of ofloxacin in patients with urinary tract or bone infections. *Rev.Infect.Dis.* 1988; 10(Suppl 1): S189-S190.

138. Gudiol, F.; Cabellos, C.; Pallares, R.; Linares, J.; Ariza, J.: Intravenous ciprofloxacin therapy in severe infections. *Am.J.Med.* 1989(Suppl. 5A): 221-224.

139. Tice, A.D.; Marsh, P.K.; Craven, P.C.: Ciprofloxacin administered orally as therapy for osteomyelitis. *Rev.Infect.Dis.* 1988; 10(Suppl. 1): S187.

140. Eron, L.J.; Gentry, L.O.: Oral ofloxacin for infections caused by bacteria resistant to oral antimicrobial agents. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.* 1992; 15: 435-439.

141. Kanellakopoulou, K.; Giamarellou, H.: Clinical experience with parenteral and oral ofloxacin in severe infections. *Scand.J.Infect.Dis. Suppl.* 1990; 68: 64-69.

142. Scully, B.E.; Clynes, N.; Neu, H.C.: Oral ofloxacin therapy of infections due to multiply-resistant bacteria. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.* 1991; 14: 435-441.
143. Picazo, J.J.: Antimicrobianos con actividad sobre *Pseudomonas*. Mesa Redonda sobre Infecciones por *Pseudomonas*. VI Congreso Nacional de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Valencia. 1994.
144. Garau, J.: Bacteriemias por *Pseudomonas*: Estudio multicéntrico. Mesa Redonda sobre Infecciones por *Pseudomonas*. VI Congreso Nacional de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Valencia. 1994.
145. Gentry, L.O.; Rodríguez-Gómez, G.: Ofloxacin versus parenteral therapy for chronic osteomyelitis. *Antimicrob.Agents Chemother.* 1991; 35: 538-541.
146. Giamarellou, H.; Perdikaris, G.; Galanakis, N.; Davoulos, G.; Mandragos, K.; Sfrikakis, P.: Pefloxacin versus ceftazidime in the treatment of a variety of gram-negative-bacterial infections. *Antimicrob.Agents Chemother.* 1989; 33: 1362-1367.
147. Mader, J.T.; Adams, K.: Experimental osteomyelitis. En: *Orthopedic Infection*. Schlossberg, D. Springer-Verlag. New York. 1988; 39-48.
148. Mader, J.T.; Wilson, K.J.: Models of osteomyelitis. En: *Experimental Models in Antimicrobial Chemotherapy*. Zak, O.; Sande, M.A. Academic Press. London. 1986; 2: 155-173.
149. Norden, C.W.; Kennedy, E.: Experimental osteomyelitis I. A description of the model. *J.Infect.Dis.* 1970; 122: 410-418.
150. Scheman, L.; Janota, M.; Lewin, P.: The production of experimental osteomyelitis. *J.A.M.A.* 1941; 117: 1525-1529.

151. Zak, O.; Zak, F.; Rich, R.; Tosch, W.; Kradolfer, R.; Scheld, W.M.: Experimental staphylococcal osteomyelitis in rats: Therapy with rifampin and cloxacillin alone or in combination. En: Current Chemotherapy and Immunotherapy. Periti, P.; Grassi, G.G. American Society for Microbiology. Washington. 1982; 973-974.

152. Deysine, M.; Rosario, E.; Isenberg, H.E.: Acute hematogenous osteomyelitis: an experimental model. Surgery. 1976; 79: 97-99.

153. Fitzgerald, R.H.: Experimental osteomyelitis: Description of a canine model and the role of depot administration of antibiotics in the prevention and treatment of sepsis. J.Bone Joint Surg. 1983; 65-A: 371-380.

154. Emslie, K.R.; Nade, S.: Acute hematogenous staphylococcal osteomyelitis: a description of the nature history in an avian model. Am.J.Pathol. 1983; 110: 333-345.

155. Passl, R.; Muller, C.; Zielinski, C.C.; Eibl, M.M.: A model of experimental post-traumatic osteomyelitis in guinea pigs. J.Trauma. 1984; 24: 323-326.

156. Wannfors, K.; Hammarstrom, L.: A proliferative inflammation in the mandible caused by implantation of an infected dental root. A possible experimental model for chronic osteomyelitis. Int.J.Oral.Maxillofac.Surg. 1989; 18: 179-183.

157. Gomis, M.; Herranz, A.; Aparicio, P.; Fe, A.; Alonso, M.J.; Prieto, J.; Martínez, T.: An experimental model of chronic osteomyelitis caused by *Escherichia coli* treated with cefotaxime. J.Antimicrob.Chemother. 1990; 26(Suppl. A): 15-21.

158. Gomis, M.; Herranz, A.; Aparicio, P.; Fe, A.; Alonso, M.J.; Prieto, J.; Martínez, T.: Experimental model for chronic osteomyelitis

caused by *E. coli* : treatment with cefotaxime. 16th International Congress of Chemotherapy. Jerusalem. 1989. Abstract book: 152.

159. Gomis, M.; Herranz, A.; Aparicio, P.; Fe, A.; Barberán, J.; Alonso, M.J.; Prieto, J.: Piperacillin as therapy for experimental osteomyelitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. 17th International Congress of Chemotherapy. Berlín. 1991; Abstract nº 182.

160. Gomis, M.; Herranz, A.; Aparicio, P.; Fe, A.; Martínez, T.; Alonso, M.J.; Prieto, J.: Modernos betalactámicos en el tratamiento de osteomielitis experimental en ratas "Wistar". *Medicina Militar*. 1990; 46: 618-627.

161. Andriole, V.T.; Nagel, D.A.; Southwick, W.O.: A paradigm for human chronic osteomyelitis. *J.Bone Joint Surg*. 1973; 55-A: 1511-1515.

162. Norden, C.W.; Kennedy, E.: Experimental osteomyelitis II. Therapeutic trials and measurement of antibiotic levels in bone. *J.Infect.Dis*. 1971; 124: 565-571.

163. Norden, C.W.; Dickens, D.R.: Experimental osteomyelitis III. Treatment with cephaloridine. *J.Infect.Dis*. 1973; 127: 525-528.

164. Norden, C.W.: Experimental osteomyelitis V. Therapeutics trials with oxacillin and sisomicin alone and in combination. *J.Infect.Dis*. 1978; 137: 155-160.

165. Dekel, S.; Francis, M.J.O.: The treatment of osteomyelitis of the tibia with sodium salicylate. An experimental study in rabbits. *J.Bone Joint Surg*. 1981; 63-B: 178-184.

166. Van Windergen, G.I.; Lolans, V.; Jackson, G.G.: Experimental *Pseudomonas* osteomyelitis. Treatment with sisomicin and carbenicillin. *J.Bone Joint Surg*. 1974; 56-A: 1452-1458.

167. Crane, L.R.; Kapdi, C.C.; Wolfe, J.N.; Silberger, B.K.; Lerner, A.M.: Xeroradiographic, bacteriologic and pathologic studies in experimental *Staphylococcus* osteomyelitis. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 1977; 156: 303-314.

168. Mayberry-Carson, K.J.; Tober-Meyer, B.; Gill, L.R.; Lambe, D.W.Jr.; Hossler, F.E.: Effect of ciprofloxacin on experimental osteomyelitis in the rabbit tibia, induced with a mixed infection of *Staphylococcus epidermidis* and *Bacteroides thetaiotaomicron*. Microbios. 1990; 64: 49-66.

169. Rissing, J.P.; Buxton, T.B.; Weinstein, R.S.; Shockley, R.K.: Model of experimental chronic osteomyelitis in rats. Infect..Inmun. 1985; 47: 581-586.

170. Hendlin, D.; Stapley, E.O.; Jackson, M.; Wallick, H.; Miller, A.K.; Wolf, F.J.; Miller, T.W.; Chalet, L.; Kahan, F.M.; Foltz, E.L.; Woodruff, H.B.; Mata, J.M.; Hernández, S.; Mochales, S.: Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of Streptomycetes. Science. 1969; 166: 122-123.

171. Baron, D.; Drugeon, H.: Fosfomicine. Sem.Hop.Paris. 1985; 61: 2341-2349.

172. Moritz, A.J.: Clinical pharmacology of fosfomicin. Proceedings of the International Symposium. Mexico. 1986. Libro Resumen: 63-76.

173. Neuman, M.: Farmacología clínica de los antibióticos. Ed. Mayo, S.A. Barcelona. 1990.

174. Mudge, G.H.: Agentes que afectan al volumen y la composición de los líquidos corporales. En: Las bases farmacológicas de la terapéutica (Edición en Español). Goodman, A.; Goodman, L.S.; Gilman, A. Ed. Panamericana. 6ª ed. Buenos Aires. 1982; 839-873.

175. Anónimo: La antibioterapia en España. Análisis estadístico
‘ 90. IMS Ibérica, S.A. Madrid. 1991.
176. García, A.; Prieto, C.: Notas sobre medicamentos. Utilización de antiinfecciosos en España durante el período 1981-1987. *Inf.Ter.Segur.Soc.* 1988; 12: 181-192.
177. Del Villar, A.: Curso Intensivo sobre Antibioticoterapia. Fosfomicina. Barcelona. 1994. *Forum.* 1994; 275: 10-11.
178. Meyer, H: Fosfomicin in cystic fibrosis. Proceedings of the International Symposium. Mexico. 1986. Libro Resumen: 131-135.
179. Prieto, A.: Fosfomicin: first phosphonic antibiotic used in the clinic. Proceedings of the International Symposium. Mexico. 1986. Libro Resumen: 1-5.
180. Gallego, A.; Rodríguez, A.; Marín, B.: Farmacodinamia de la fosfomicina. I. Estudios en animales. *An.Ins.Farm.Esp.* 1971; 20: 397-402.
181. García-Rodríguez, J.A.: Antimicrobianos. En: *Microbiología y Parasitología Médica.* Pumarola, A.; Rodríguez-Torres, A.; García-Rodríguez, J.A.; Piédrola-Angulo, G. Salvat Editores, S.A. Barcelona. 1984; 118-150.
182. Andrews, J.M.; Baquero, F.; Beltrán, J.M.; Canton, E.; Crokaert, F.; Gobernado, M.; Gómez-Lus, R.; Loza, E.; Navarro, M.; Olay, T.; Rodríguez, A.; Vicente, M.V.; Wise, R.; Yourassowsky, E.: International collaborative study on standardization of bacterial sensitivity to fosfomicin. *J.Antimicrob.Chemother.* 1983; 12: 357-361.
183. Trautmann, M.; Meincke, C.; Vogt, K.; Ruhnke, M.; Lajous-Petter, A.M.: Intracellular bactericidal activity of fosfomicin against staphylococci: a comparison with other antibiotics. *Infection.* 1992; 20: 350-354.

184. Amurrio, C.; Nicolás, R.; Larrauri, L.; López, A.; Cisterna, R.: Efecto de la eritromicina y la fosfomicina en la capacidad de ingestión y destrucción del leucocito polimorfonuclear humano. *Enf.Infec.Microbiol.Clin.* 1989; 7: 374-376.

185. Höger, P.H.: Influence of intracellularly active antibiotics (fosfomicin, rifampin, sulfamethoxazole, trimethoprim) on normal neutrophil function *in vitro*. Proceedings of the International Symposium. Mexico. 1986. Libro Resumen: 46-57.

186. Kayser, H.: Activity of fosfomicin against grampositive bacteria. Proceedings of the International Symposium. Mexico. 1986. Libro Resumen: 13-16.

187. Obaseki-Ebor, E.E.: Activity of fosfomicin and R-plasmid conferring fosfomicin resistance among some clinical bacteria isolates in Nigeria. *Chemotherapy.* 1986; 32: 31-36.

188. Gobernado, M.; Cantón, E.; Santos, M.; Vila, B.: Antimicrobial profile of fosfomicin after 12 years use in a general hospital. Proceedings of the International Symposium. Mexico. 1986. Libro Resumen: 6-12.

189. Salhi, A.; Combes, T.; Roche, G.; Roncucci, R.: *In vitro* combinations studies with fosfomicin. Proceedings of the International Symposium. Mexico. 1986. Libro Resumen: 34-45.

190. Fillastre, J.P.; Moulin, B.; Morin, J.P.; Viotte, G.; Bendirdjian, J.P. Fosfomicin and renal tolerance. Proceedings of the International Symposium. Mexico. 1986. Libro Resumen: 81-91.

191. Kazmierczak, A.; Duez, J.M.; Pechinot, A.; Nordmann, H.; Portier, H.; Labia, R.: *In vitro* bactericidal synergy of fosfomicin in combination with beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus*

aureus and multidrug resistant *Enterobacteriaceae*. Proceedings of the International Symposium. Mexico. 1986. Libro Resumen: 28-33.

192. Neu, H.C.; Chin, N.X.: In vitro activity of fleroxacin in combination with other antimicrobial agents. Am.J.Med. 1993; 94(Suppl. 3A): 9-16.

193. Rodríguez, A.; Olay, T.; Vicente, M.V.: *In vitro* activity of fosfomycin alone and combined against methicillin-resistant staphylococci. Proceedings of the International Symposium. Mexico. 1986. Libro Resumen: 23-27.

194. Vicente, M.V.; Rodríguez, A.; Olay, T.: Fosfomycin in the treatment of experimental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. Proceedings of the International Symposium. Mexico. 1986. Libro Resumen: 58-62.

195. Chavanet, P.; Muggeo, E.; Waldner, A.; Dijoux, S.; Caillot, D.; Portier, H.: Synergism between cefotaxime and fosfomycin in the therapy of methicillin and gentamicin resistant *Staphylococcus aureus* infection in rabbits. Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis. 1990; 9: 271-275.

196. Chin, N.X.; Neu, H.C.: Synergy of fosfomycin and other beta-lactams against resistant bacteria. Proceedings of the International Symposium. Mexico. 1986. Libro Resumen: 17-22.

197. Portier, H.; Armengaud, M.; Becq-Giraudon, B.; Bousser, J.; Desbordes, J.M.; Duez, J.M.; Kazmierczak, A.; Korinek, A.M.; Laisne, M.J.; Pangon, B.; Peyramond, D.; Rémy, G.; Thierry, A.; Vernet, V.; Veyssier, P.; Wolff, M.: Traitement par l'association céfotaxime-fosfomycine des méningites de l'adulte à staphylocoques ou à entérobactéries. Presse Med. 1987; 16: 2161-2166.

198. Figueredo, V.M.; Neu, H.C.: Synergy of ciprofloxacin with fosfomicin in vitro against *Pseudomonas* isolates from patients with cystic fibrosis. *J.Antimicrob.Chemother.* 1988; 22: 41-50.

199. Neu, H.C.: Synergy of fluorquinolones with other antimicrobial agents. *Rev.Infect.Dis.* 1989; 11(Suppl. 5): S1025-S1035.

200. Pastor, A.; Cantón, E.; Gobernado, M.: Efecto postantibiótico (EPA). II. Antimicrobianos en que se ha descrito EPA, con especial referencia a las quinolonas. *Rev.Esp.Quimioterap.* 1992; 5: 211-218.

201. Baron, D.; Desjars, Ph.; Touze, M.D.; Tasseau, F.; Potel, G.: Clinical study on combined therapy with fosfomicin for staphylococcal infections. *Proceedings of the International Symposium. Mexico.* 1986. Libro Resumen: 172-188.

202. Fernández-Valencia, J.E.; Saban, T.; Cañedo, T.; Olay, T.: Fosfomicin in osteomyelitis. *Chemotherapy.* 1976; 22: 121-134.

203. Rubio, M.C.: Tratamiento antibiótico de las infecciones; conclusiones. Mesa Redonda sobre *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina patrocinada por la Sociedad Regional de Microbiología de Aragón, Navarra, La Rioja y Soria. Zaragoza. 1994.

204. Arca, P.; Hardisson, C.; Suárez, J.E.: Purification of a glutathione S-transferase that mediates fosfomicin resistance in bacteria. *Antimicrob.Agents Chemother.* 1990; 34: 844-848.

205. Villar, C.J.; Hardisson, C.; Suárez, J.E.: Cloning and molecular epidemiology of plasmid-determined fosfomicin resistance. *Antimicrob.Agents Chemother.* 1986; 29: 309-314.

206. Guggenbichler, J.P.; Bonatti, H.; Rottensteiner, F.: Resistance of intracellular killing of staphylococci by macrophages as new pathophysiologic concept of acute hematogenous osteomyelitis in children

and therapeutic consequences. Proceedings of the International Symposium. Mexico. 1986. Libro Resumen: 145-153.

207. Hernández, V.: Fosfomicin in a traumatological department. *Chemotherapy*. 1977; 23(Suppl. 1): 403-410.

208. Roth, B.; Mattarelli, G.; Bartels, F.: Fosfomicin in the treatment of chronic osteitis. Proceedings of the International Symposium. Mexico. 1986. Libro Resumen: 154-157.

209. Potel, G.; Baron, D.: Expérience de la fosfomicine dans le traitement des staphylococcies ostéo-articulaires. *Sem.Hop.Paris*. 1987; 63: 3559-3562.

210. Meißner, A.; Haag, R.; Rahmzadeh, R.: Adjuvant fosfomicin medication in chronic osteomyelitis. *Infection*. 1989; 17: 146-151.

211. Carrasco, J.L.: El método estadístico en la investigación médica. Ed. Ciencia 3, S.A. 4ª ed. Madrid. 1989.

212. Bartlett, J.G.; Louie, T.J.; Gorbach, S.L.; Onderdonk, A.B.: Therapeutic efficacy of 29 antimicrobial regimens in experimental intraabdominal sepsis. *Rev.Infect.Dis*. 1981; 3: 535-542.

213. Freireich, E.J.; Gehan, E.A.; Rall, D.P.; Schmidt, L.H.; Skipper, H.E.: Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. *Cancer Chemother.Reports*. 1966; 50: 219-244.

214. Grove, D.C.; Randal, W.A.: Assay methods of antibiotics. A laboratory manual. *Medical Encyclopedie*. New York. 1955.

215. Olay, T.: Difusión de fosfomicina y otros antibióticos a líquidos tisulares en animales de experimentación. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. 1983.

216. González, J.L.: Farmacocinética (III): leyes generales. En: Farmacología y su proyección a la clínica. Velázquez, B. L. Ed. Oteo. 15ª ed. Madrid. 1987; 55-68.

217. Foster, T.S.; Bourne, T.E.: Use of a programmable hand-held calculator for clinical pharmacokinetic. Am.J.Hosp.Pharm. 1977; 34:70.

218. Plá-Encina, J.M.; Del Pozo, A.: Manual de iniciación a la biofarmacia. Ed. Romagraf. Barcelona. 1979.

219. Rodet, A.: Physiologie pathologique-étude experimentale sur l'osteomyelite infectieuse. CR.Acad.Sci. 1885; 99: 569-571.

220. Lexer, E.: Zur experimentellen erzeugung osteomyelitischer herde. Arch.Klin.Chir. 1894; 48: 181-200.

221. Starr, C.L.: Acute hematogenous osteomyelitis. Arch.Surg. 1922; 4: 567-587.

222. Haldeman, K.O.: Acute osteomyelitis. A clinical and experimental study. Surg.Gynecol.Obstet. 1934; 59: 25-31.

223. Thompson, R.H.S.; Dubos, R.J.: Production of experimental osteomyelitis in rabbits by intravenous injection of *Staphylococcus aureus*. J.Exp.Med. 1938; 68: 191-206.

224. LaMont, J.T.; Sonnenblick, E.B.; Rothman, S.: Role of clostridial toxin in the pathogenesis of clindamycin colitis in rabbits. Gastroenterology. 1979; 70: 356-361.

225. Spagnolo, N.; Greco, F.; Rossi, A.; Ciolli, L.; Teti, A.; Posteraro, P.: Chronic staphylococcal osteomyelitis: a new experimental rat model. Infect.Immun. 1993; 61: 5225-5230.

226. Norden, C.W.; Shinnors, E.; Niederriter, K.: Clindamycin tratment of experimental chronic osteomyelitis due to *Staphylococcus aureus*. J.Infect.Dis. 1986; 153: 956-959.

227. Luu, Q.; Buxton, T.B.; Nelson, D.; Rissing, J.P.: Experimental chronic *S. aureus* osteomyelitis. Treatment with LY146032, vancomycin and/or rifampin. 27th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. New York. 1987. Abstract n° 173.

228. Johansson, A.; Eliasson, G.; Svensson, O.; Nord, C.E.: Anaerobic osteomyelitis: treatment with metronidazole in an experimental rabbit model. *Drugs Exptl.Clin.Res.* 1991; 17: 299-304.

229. Mader, J.T.; Wilson, K.J.: Comparative evaluation of cefamandole and cephalotin in the treatment of experimental *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in rabbits. *J.Bone Joint Surg.* 1983; 65-A: 507-513.

230. Mader, J.T.; Adams, K.; Morrison, L.: Comparative evaluation of cefazolin and clindamycin in the treatment of experimental *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in rabbits. *Antimicrob.Agents Chemother.* 1989; 33: 1760-1764.

231. Norden, C.W.; Budinsky, A.: Aztreonam therapy for experimental osteomyelitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Infect.Dis.* 1988; 158: 660-661.

232. Gomis, M.; Barberán, J.; Herranz, A.; Aparicio, P.; Fe, A.; Alonso, M.: Short guide lines of treatment in experimental osteomyelitis. 5th International Congress for Infectious Diseases. Nairobi. 1992. Abstract n° 92.

233. Alonso, J.L.; Alonso, M.A.: Estudio de la resistencia a antibióticos de *Pseudomonas aeruginosa* aislados de aguas marinas contaminadas de Puebla de Farnals (Valencia). *Rev.Esp.Microbiol.Clin.* 1990; 5: 86-88.

234. López-Yeste, M.L.; Tirado, M.; Reig, R.; Roy, C.: Sensibilidad a los antibióticos de *Pseudomonas aeruginosa*. Rev.Esp.Quimioterap. 1992; 5: 137-141.

235. Prieto, J.; Gómez-Lus, M.L.: Importancia epidemiológica y control de las resistencias. Rev.Esp.Quimioterap. 1989; 2(Supl. 3): 21-24.

236. Mouton, J.W.; Den Hollander, J.G.; Horrevorts, A.M.: Emergence of antibiotic resistance amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. J.Antimicrob.Chemother. 1993; 31: 919-926.

237. Chin, N.X.; Clynes, N.; Neu, H.C.: Resistance to ciprofloxacin appearing during therapy. Am.J.Med. 1989; 87(Suppl. 5A): 28-31.

238. Zuccarelli, M.; Simeon de Buochberg, M.; Maillols, H.; Dusart, G.; Atisso, M.A.: Effect post-antibiotique de la ciprofloxacine seule et en association sur *Streptococcus faecalis*. Pathol.Biol. 1988; 36: 410-413.

239. Mínguez, F.; Aparicio, P.; Lurueña, S.; Cabronero, M.J.; Prieto, J.: Influencia de las asociaciones bacterianas sobre el efecto postantibiótico. Enf.Infec.Microbiol.Clin. 1990; 8: 208-212.

240. Pastor, A.; Cantón, E.; Gobernado, M.: Efecto postantibiótico (EPA). I. Métodos de estudio y factores influyentes. Rev.Esp.Quimioterap. 1992; 5: 201-210.

241. Marget, W.; Lohse, K.: Fosfomicin in the treatment of infections difficult to treat. Proceedings of the International Symposium. Mexico. 1986. Libro Resumen: 229-231.

242. Gerard, A.; Menard, O.; Canton, Ph.; Roche, G.; Dureux, J.B.: The place of fosfomicin and its association in the treatment of

staphylococcal septicemias (endocarditis excluded). Proceedings of the International Symposium. Mexico. 1986. Libro Resumen: 158-165.

243. Gudín, J.; Santos, M.; Ruano, M.; Rafecas, J.; Gobernado, M.: Fosfomicin in the treatment of septicemia. Proceedings of the International Symposium. Mexico. 1986. Libro Resumen: 166-171.

244. Guggenbichler, J.P.: Treatment of bacterial meningitis with fosfomicin. Proceedings of the International Symposium. Mexico. 1986. Libro Resumen: 215-222.

245. Micoud, M.; Croize, J.; Bru, J.P.; Stahl, J.P.; Gaillat, J.: Fosfomicin kinetics studies and clinical experience in bacterial meningitis. Proceedings of the International Symposium. Mexico. 1986. Libro Resumen: 198-204.

246. Nissen, L.R.; Jacobsen, J.; Ravn, T.J.; Wahlgreen, C.; Auning-Hansen, H.: Fosfomicin-ampicillin versus gentamicin-ampicillin in the treatment of critically ill patients with pneumonia. *Infection*. 1986; 14: 246-249.

247. Tritthart, H.: Fosfomicin in cerebral and spinal abscesses. Proceedings of the International Symposium. Mexico. 1986. Libro Resumen: 223-228.

248. Bergan, T.: Degree of absorption, pharmacokinetics of fosfomicin trometamol and duration of urinary antibacterial activity. *Infection*. 1990; 18(Suppl. 2): S65-S69.

249. Grassi, G.G.: Fosfomicin trometamol: historial background and clinical development. *Infection*. 1990; 18(Suppl. 2): S57-S59.

250. Bergan, T.: Pharmacokinetic comparison between fosfomicin and other phosphonic acid derivatives. *Chemotherapy*. 1990; 36(Suppl. 1): 10-18.

251. Anónimo: MONUROL. Fosfomicina trometamol. Dossier científico. Laboratorios Zambón. Sin fecha. Pág. 8.

252. Anónimo: Notas Informativas: Ketorolac. Boletín Informativo del Centro de Farmacovigilancia de Aragón. 1994;1. Sin paginación.

253. Goetz, C.M.; Sterchele, J.A.; Harchelroad, F.P.: Anaphylactoid reaction following ketorolac tromethamine administration. *Ann.Pharmacother.* 1992; 26: 1237-1238.

254. Pearce, C.J.; González, F.M.; Wallin, J.D.: Renal failure and hyperkalemia associated with ketorolac tromethamine. *Arch.Intern.Med.* 1993; 153: 1000-1002.

255. Redden, R.J.: Ketorolac tromethamine: an oral/injectable nonsteroidal anti-inflammatory for postoperative pain control. *J.Oral Maxillofac.Surg.* 1992; 50: 1310-1313.

256. Schoch, P.H.; Ranno, A.; North, D.S.: Acute renal failure in an elderly woman following intramuscular ketorolac administration. *Ann.Pharmacother.* 1992; 26: 1233-1236.

257. Azanza, J.R.; Catalán, M.; Honorato, J.; Tristán, C.; Ariño, M.: Utilidad práctica de los parámetros farmacocinéticos de los antibióticos. *Rev.Esp.Quimioterap.* 1989; 2: 81-86.

258. Lietman, P.S.: Farmacocinética de los agentes antimicrobianos. En: *Enfermedades Infecciosas. Principios y práctica (Edición en Español)*. Mandell, G.L.; Douglas, R.G.; Bennet, J.E. Ed. Panamericana. 3ª ed. Buenos Aires. 1991; 237-240.

259. Mínguez, F.; Prieto, J.: Efecto postantibiótico. *Enf.Infec. Microbiol.Clin.* 1993; 11: 147-155.

260. Calvo, B.; Pedraz, J.L.; Gascón, A.R.; Domínguez-Gil, A.: Validez de la investigación preclínica en el desarrollo de nuevos

antibióticos. Aspectos farmacocinéticos. *Enf.Infec.Microbiol.Clin.* 1991; 9: 361-369.

261. Kolczun, M.C.; Nelson, C.L.; McHenry, M.C.; Gavan, T.L.; Pinovich, P.: Antibiotic concentrations in human bone. A preliminary report. *J.Bone Joint Surg.* 1974; 56-A: 305-310.

262. Wittman, D.H.: Chemotherapeutic principles of difficult-to-treat infections in surgery: II. Bone and joint infections. *Infection.* 1980; 8: 330-333.

263. Wittman, D.H.; Schassan, H.H.: Bone concentrations of six new β -lactam antibiotics. *Curr.Chemother.Immunother.* 1982; 1: 628-630.

264. Papathanassiou, B.; Kosmidis, J.; Daikos, G.K.: Comparative study of the concentration of cefoperazone and ceftazidime in bone. *Curr.Chemother.Immunother.* 1982; 1: 503-504.

265. Etesse, H.; Garraffo, R.; Dellamonica, P.; Bernard, E.: Diffusion of ciprofloxacin, ofloxacin, and pefloxacin in bone tissue. *Rev.Infect.Dis.* 1988; 10(Suppl. 1): S185-S186.

266. Wittman, D.H.; Kotthaus, E.: Further methodological improvement in antibiotic bone concentration measurements: penetration of ofloxacin into bone and cartilage. *Infection.* 1986; 14(Suppl. 4): S270-S273.

267. Fong, I.W.; Ledbetter, W.H.; Vandenbroucke, A.C.; Simbul, M.; Rahm, V.: Ciprofloxacin concentrations in bone and muscle after oral dosing. *Antimicrob.Agents Chemother.* 1986; 29: 405-408.

268. Hughes, S.P.F.; McCarthy, I.D.; Fleming, R.M.; Anderson, F.M.; Dash, C.H.: Extraction of ceftazidime in bone. *J.Antimicrob.Chemother.* 1984; 14: 285-289.

269. Fernández Lastra, C.; Mariño. E.L.; Domínguez-Gil, A.: Linearity of the pharmacokinetics of phosphomycin in serum and interstitial tissue fluid in rabbits. *Drug Res.* 1986; 36: 1518-1520.

270. Fernández Lastra, C.; Mariño. E.L.; Domínguez-Gil, A.: Phosphomycin levels in serum and interstitial tissue fluid in a multiple dosage regimen in rabbits. *Drug Res.* 1987; 37: 927-929.

271. O'Reilly, T.; Kunz, S.; Sande, A.; Zak, O.; Sande, M.A.; Tauber, M.G.: Relationship between antibiotic concentration in bone and efficacy of treatment of staphylococcal osteomyelitis in rats: azithromycin compared with clindamycin and rifampin. *Antimicrob.Agents Chemother.* 1992; 36: 2693-2697.

272. Vicente, M.V.; Moreno, A.; Olay, T.; Rodríguez, A.; Oliver, L.E.: The diffusion of fosfomycin to interstitial tissue fluids in experimental animals. *Drugs Exptl.Clin.Res.* 1977; 3: 193-200.

273. Vicente, M.V.; Olay, T.; Quecedo, M.C.R.; Rodríguez, A.: Diffusion of β -lactam antibiotics and fosfomycin to interstitial tissue fluid in rabbits. *Chemotherapy.* 1979; 25: 329-335.

274. Sirot, J.; Lopitiaux, R.; Dumont, C.; Rampon, S.; Cluzel, R.: Diffusion de la fosfomycine dans le tissu osseux chez l'homme. *Pathol.Biol.* 1983; 31: 522-524.