UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

TESIS DOCTORAL

" Estudio del efecto postantibiotico en tres quinolonas "

Juan Carlos Alados Arboledas
Granada 1990.

UNIVERSIDAD DE GRANADA

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR EN FARMACIA

Curso de 1990 a 1991 Folio Número

Reunido en el día de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D. Juan Carlos Alados Arboledas, el aspirante leyó un discurso sobre el siguiente tema, que libremente había elegido: "Estudio del efecto postantibiótico en tres quinolonas"

Terminada la lectura y contestadas las objeciones formuladas por los Jueces del Tribunal, éste le calificó de Apto "cum laude" por unanimidad

Granada, Dos de Octubre de 1990

EL PRESIDENTE,

El Secretario del Tribunal,

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,

Firma del Graduado,

INVESTIDURA . . En el día de la fecha se ha conferido a D. ..... el Grado de Doctor en la Facultad de ....., conforme a lo prevenido en las disposiciones vigentes.

Granada, de de 19

EL DECANO,

CERTIFICO: Que el Acta que antecede concuerda con la del expediente del interesado remitida a la Secretaría de la Universidad.

Granada, de de 19

El Catedrático Secretario,

V.° B.°
EL DECANO,

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

FACULTAD DE MEDICINA

PROF. G. PIEDROLA
PROF.ª M. C. MAROTO

AVENIDA DE MADRID, 11
TLFNO. 958 / 20 01 45
18012 - GRANADA

EL PROFESOR DR. D. GONZALO PIEDROLA ANGULO, CATEDRATICO DE MICROBIOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal que designe la Comisión del Doctorado a propuesta del Consejo de Departamento D. JUAN CARLOS ALADOS ARBOLEDAS sobre el tema: **Efecto postantibiótico en tres quinolonas**, ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor, en condiciones tan aventajadas que lo hacen acreedor del titulo de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada 12 de julio de 1.990

Fdo. Gonzalo Piédrola Angulo

FACULTAD DE MEDICINA Cátedra de Microbiología GRANADA

A María José

Antes de iniciar el desarrollo del presente trabajo, es un honor y una satisfacción personal, mencionar a todos aquellos que con su ayuda lo han hecho posible y a los que quiero expresar mi más sincero agradecimiento.

Al Profesor Dr. D. Gonzalo Piédrola de Angulo, Catedrático y Jefe del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, Director de esta Tesis, por haberme formado como Microbiólogo y por su constante apoyo que ha hecho posible la realización de este trabajo.

A la Profesora Dra. Dña. M. Carmen Maroto Vela, Caterdrático y Jefe del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico de Granada, por haber contado en todo momento con su inestimable ayuda.

Al Profesor Dr. D. José Prieto Prieto y su equipo, por haberme iniciado en el estudio del Efecto Postantibiótico.

Al Dr. Liébana y Dra. Castillo por su paciencia, buenos consejos y aportación de ideas a este trabajo.

A los Doctores Peco, Román, Pérez-López y a las Doctoras Bernal y Escobar por la formación que me han ofrecido durante estos años y el apoyo en este trabajo.

Al Dr. García y Dra. Quirós, compañeros y amigos, por ofrecerme su inestimable ayuda.

Mi agradecido recuerdo a las iniciativas y entusiasmo que despertó en mí, mi primer Maestro en Microbiología, Profesor Dr. D. Alberto Ramos Cormenzana, por su enseñanza en mis primeros pasos.

Al personal Auxiliar del Servicio de Microbiología, en especial al de cocina, que han colaborado de forma totalmente desinteresada en la realización de este trabajo.

Muchas otras personas me han ayudado y apoyado, y aunque no es posible nombrarlas aquí, todos cuentan con mi gratitud y afecto; sin embargo, quiero mencionar a mi familia y amigos que me han soportado durante todo este tiempo, no siempre fácil, y de forma especial a María José por su comprensión y ayuda en la escritura de esta Tesis.

PROLOGO.

La determinación "in vitro" de la susceptibilidad, concentración mínima inhibitoria (CMI), de un microorganismo frente a un antimicrobiano está indicada cuando la sensibilidad del microorganismo no es predictible o bien se sospecha de la aparición de resistencias en el transcurso del tratamiento. Este parámetro, CMI, es el que habitualmente se ha venido utilizando como base para el estableciemiento de las dosis y pautas de administración de los antibióticos, de forma que se fija como objetivo mantener los niveles séricos de fármaco por encima de la CMI durante el tratamiento. Este criterio se remonta varias décadas atrás, basándose en los modelos experimentales de EAGLE y col. para la administración de penicilina.

Rara vez se consideran otros parámetros implicados en la actividad de los antimicrobianos, tales como la cinética de letalidad o actividad bactericida en el tiempo; el efecto postantibiótico o retraso del crecimiento de los microorganismos previamente expuestos a concentraciones suprainhibitorias; y fenómenos asociados que se originan en el transcurso de un tratamiento. Un mejor conocimiento de estos parámetros aportaría nuevas bases, sobre las ya existentes, para un más racional establecimiento de los tratamientos. Así, un prolongado efecto postantibiótico justificaría un distanciamiento en las administraciones del fármaco con el consecuente beneficio para el enfermo y la disminución del consumo de antibimicrobiano, sin perjuicio de su eficacia.

Los diversos autores han centrado, en general, sus estudios en el grupo de antibióticos ß-lactámicos y aminoglucósidos siendo, por el contrario, escasos los datos disponibles acerca del efecto postantibiótico de los inhibidores de la girasa, grupo terapéutico de gran interés en la actualidad. Fué por ello que nos propusimos como meta de este estudio, ampliar los conocimientos en este campo mediante los siguientes objetivos:

1.- Determinar el efecto bactericida en el tiempo de los inhibidores de la girasa, ácido nalidíxico, norfloxacino y ciprofloxacino, ensayados a distintas concentraciones sobre aislados clínicos de Shigella sonnei, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae y Pseudomonas aeruginosa.

2.- Evaluar la capacidad de los inhibidores de la girasa, señalados en el apartado anterior, para inducir efecto postantibiótico en los microorgamismos antes indicados, valorando la influencia de los factores concentración, tiempo de exposición y medio de cultivo.

Para ello hemos dividido nuestro estudio en cuatro capítulos:

El primero dedicado a las generalidades a cerca de los antimicrobianos inhibidores de la girasa, el cual lo hemos dividido a su vez en cinco partes en las que se revisan historia,

clasificación, mecanismo de acción, resistencias y espectro de actividad e indicaciones.

El segundo capítulo consta de tres partes en las que repasamos las técnicas para el estudio de la sensibilidad y actividad bactericida en bacterias aerobias, y hacemos una revisión del efecto postantibiótico.

El tercer capítulo corresponde a la aportación personal y consta de cinco partes: La primera refleja los objetivos propuestos al inicio de este estudio; la segunda está dedicada al material y métodos, que incluye una relación de los microorganismos y antimicrobianos ensayados, la composición de los medios de cultivo utilizados y la descripción de las técnicas empleadas para el estudio de la sensibilidad (CMI), efecto bactaricida en el tiempo, efecto postantibiótico y el tratamiento estadístico aplicado. En la tercera presentamos nuestros resultados, correspondiendo la discusión de los mismos a la cuarta parte. El último apartado está dedicado a nuestras conclusiones.

Finalmente, en el cuarto capítulo, reflejamos la bibliografía consultada a lo largo de este estudio.

INDICE

CAPITULO PRIMERO. GENERALIDADES SOBRE LOS ANTIMICROBIANOS pg.
INHIBIDORES DE LA GIRASA.....14

1.1.- Historia.....15

1.2.- Clasificación.....19

1.3.- Mecanismo de acción.....21

1.4.- Resistencias a los inhibidores de la girasa.....33

1.5.- Espectro de actividad, indicaciones y niveles biológicos.....40

CAPITULO SEGUNDO. ESTADO ACTUAL DE LOS PARAMETROS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN BACTERIAS AEROBIAS.....45

2.1.- Técnicas de estudio de sensibilidad. Concentración mínima inhibitoria.....48

2.1.1.- Prueba de difusión.....48

2.1.2.- Prueba de dilución.....50

2.1.3.- Pruebas automatizadas.....54

2.2.- Técnicas para el estudio de la actividad bactericida.....56

2.2.1- Determinación de la concentración mínima bactericida.....57

2.2.2.- Determinación de la actividad bactericida del suero.....58

2.2.3.- Actividad bactericida en el tiempo.....59

2.3.- Efecto postantibiotico (EPA).....63

2.3.1.- Factores que influyen sobre el EPA.....65

2.3.2.- Mecanismo del EPA.....80

2.3.3.- Efectos relacionedos con el EPA.....82

2.3.4.- Determinación "in vitro" del EPA.....85

2.3.5.- Determinación "in vivo" del EPA.....91

CAPITULO TERCERO. APORTACION PERSONAL.....93

3.1.- Objetivos.....94

3.2.- Material y métodos.....96

3.2.1.- Microorganismos estudiados.....97

3.2.2.- Antimicrobianos ensayados.....98

3.2.3.- Medios de cultivo utilizados.....99

3.2.4.- Descripción del estudio de la sensibilidad. Técnica de CMI.....102

3.2.5.- Descripción del estudio del efecto bactericida en el tiempo.....105

3.2.6.- Descripción del estudio del efecto postantibiótico.....109

3.2.7.- Tratamiento estadístico.....112

3.3.- Resultados.....113

3.3.1.- Estudio de la sensibilidad de los microorganismos a las tres quinolonas.....114

3.3.2.- Puesta a punto y adaptación de la técnica de estudio del EPA.....119

3.3.3.- Estudio del efecto bactericida en el tiempo.....122

3.3.4.- Estudio del EPA de a. nalidíxico, norfloxacino y ciprofloxacino.....145

3.3.5.- Estudio del EPA de ácido nalidíxico, norfloxacino y ciprofloxacino en orina.....188

3.4.- Discusión.....194

3.5.- Conclusiones.....212

CAPITULO CUARTO. BIBLIOGRAFIA.....215

CAPITULO PRIMERO. GENERALIDADES SOBRE LOS ANTIMICROBIANOS INHIBIDORES DE LA GIRASA.

Las quinolonas, también conocidas como inhibidores de la girasa, son productos de síntesis que tienen en común, como estructura central, un ácido carboxílico con átomos de oxígeno alrededor, responsables de la actividad antibacteriana. Inhiben las topoisomerasas o girasas del ácido desoxirribonucleico, por lo que se justifica su denominación de inhibodores de la girasa.

1.1.- HISTORIA.

En el año 1949, PRICE obtuvo, mediante degradación de alcaloides, una molécula sin actividad biológica, era la 4-quinolona (Figura 1). Algunos años después se descubrieron otras moléculas de la misma familia, algunas de las cuales tenían actividad antimicrobiana, de forma que en 1960 ya se conocían hasta 60 derivados pero ninguno con aplicación clínica.

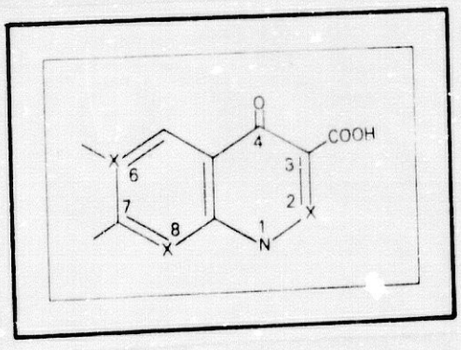


FIGURA 1. Estructura química de la 4-quinolona.

Acido nalidíxico fué el primer compuesto descrito, de este grupo, con aplicación clínica. Su síntesis se debe al descubrimiento, durante el proceso de purificación de la cloroquina a partir de las lejías madre, de que la 7-cloroquinolina resultante poseía actividad antimicrobiana (LESHER y col 1962). El ácido nalidíxico es más eficaz contra las bacterias Gram-negativas que contra la Gram-positivas y ha demostrado su utilidad en el tratamiento de las infecciones urinarias. Se constató su buena tolerancia en el hombre y también su excelente excrección urinaria a concentraciones terapeúticamente eficaces, incluso en caso de insuficiencia renal (LOWENTRITT y SCHLEGEL 1969; STAMEY y col 1969). Debido a su específica eficacia contra bacterias Gram-negativas, el ácido nalidíxico se mostró ventajoso también en las infecciones intestinales, sobretodo en la disentería producida por Shigella sonnei (MOORHEAD y PARRY 1965). Aunque "in vitro" son relativamente fáciles de aislar bacterias resistentes al ácido nalidíxico (BARLOW 1963; BUCH-BINDER y col 1963), numerosos estudios llevados a cabo sobre la resistencia de bacterias procedentes de aislados clínicos, tomados durante infecciones de las vías urinarias, pudieron poner de manifiesto que a pesar de la amplia utilización clínica de esta sustancia continuan siendo sorprendentemente raras (BALL y WALLACE 1974; MC ALLISTER y col 1971).

Desde la introducción en la clínica del ácido nalidíxico, se han desarrollado otras sustancias químicamente

afines a las 4-quinolonas. En la figura 2 se muestra la cronología de estos compuestos desde sus orígenes. La estructura de la 4-quinolona, con la numeración del anillo, y la de varios antimicrobianos derivados de esta, se muestran en las figura 1 y 3. Con el descubrimiento relativamente nuevo de lomefloxacino y ciprofloxacino, esta última de una eficacia 1000 veces superior a la del ácido nalidíxico, se ha acelerado en los últimos años, como ejemplo sin precedentes, el desarrollo de nuevos inhibidores de la girasa. La razón de este interés radica en hacer asequibles al tratamiento con nuevos inhibidores de la girasa, al creciente número de bacterias resistentes al ácido nalidíxico.

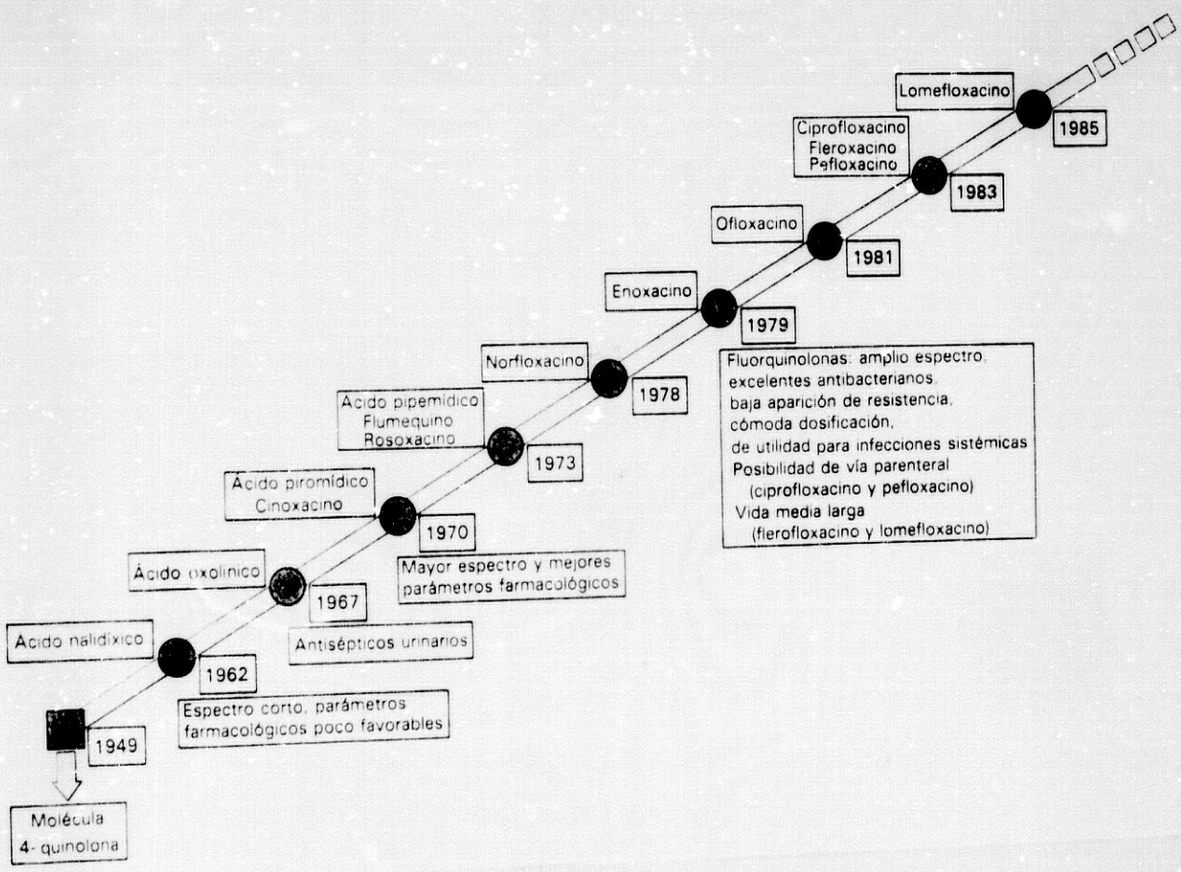


FIGURA 2. Cronología de las quinolonas.

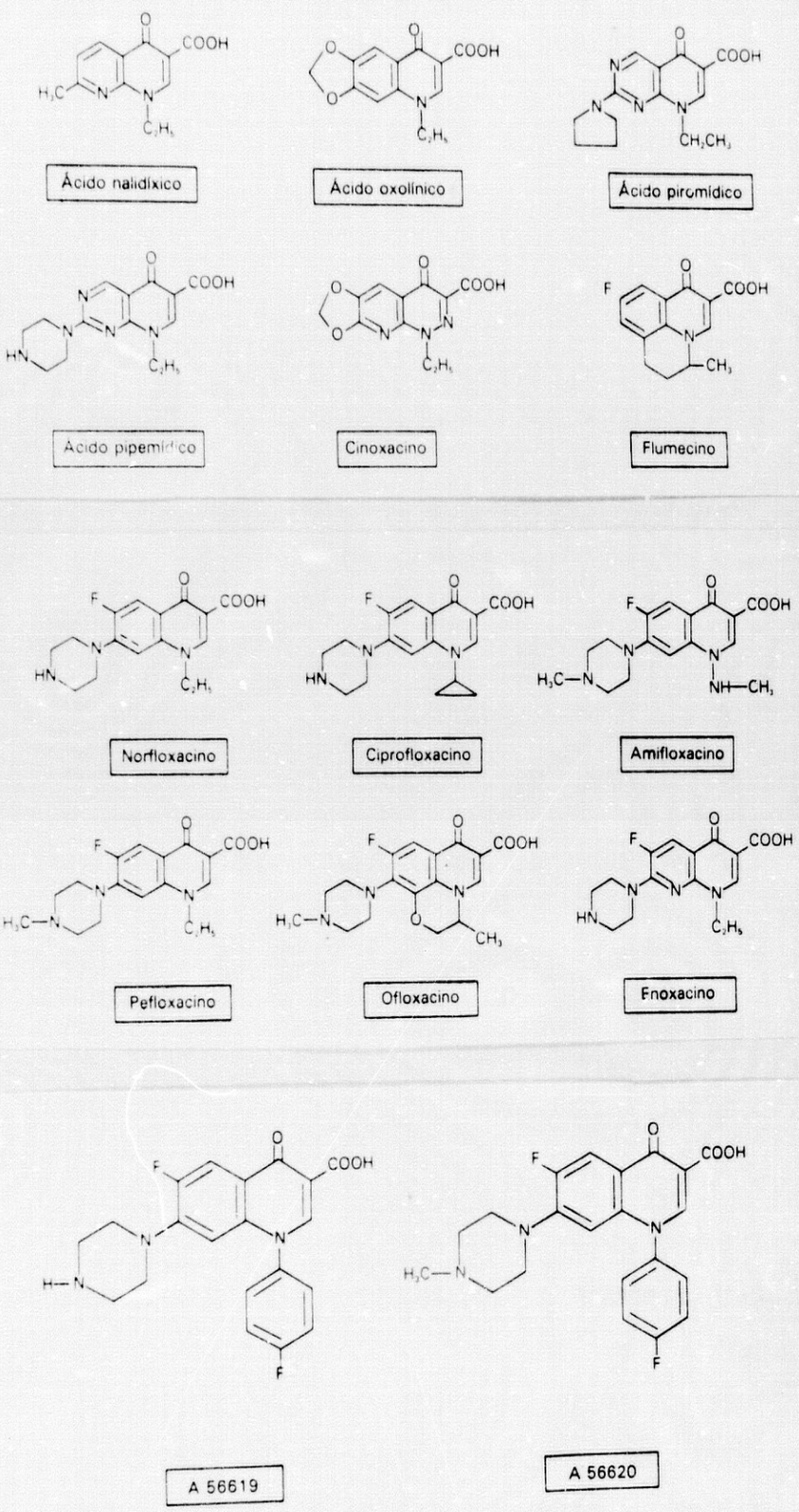


FIGURA 3.- Estructura química de diversas quinolonas.

1.2.- CLASIFICACION.

Se conocen numerosos compuestos con diferentes espectros de acción y potencia. Basándonos en la estructura química podemos clasificarlos en cinco grupos:

- Naftiridinas: nalidíxico y piromídico.
- Oxacinas: cinoxacino y oxolínico.
- Con grupo piperazinil: pipemídico y roxoxacino.
- Monofluorados con grupo piperazinil: amifloxacino, ciprofloxacino, enoxacino, norfloxacino, ofloxacino y pefloxacino.
- Difluorados: lomefloxacino, A 56619, A 56620.

El radical piperazinil confiere a la molécula actividad sobre pseudomonas; la adición de un átomo de flúor en posición 6 aumenta su actividad antibacteriana ampliando su espectro de acción, llegando a comprender a las bacterias gram-positivas (Figura 4).

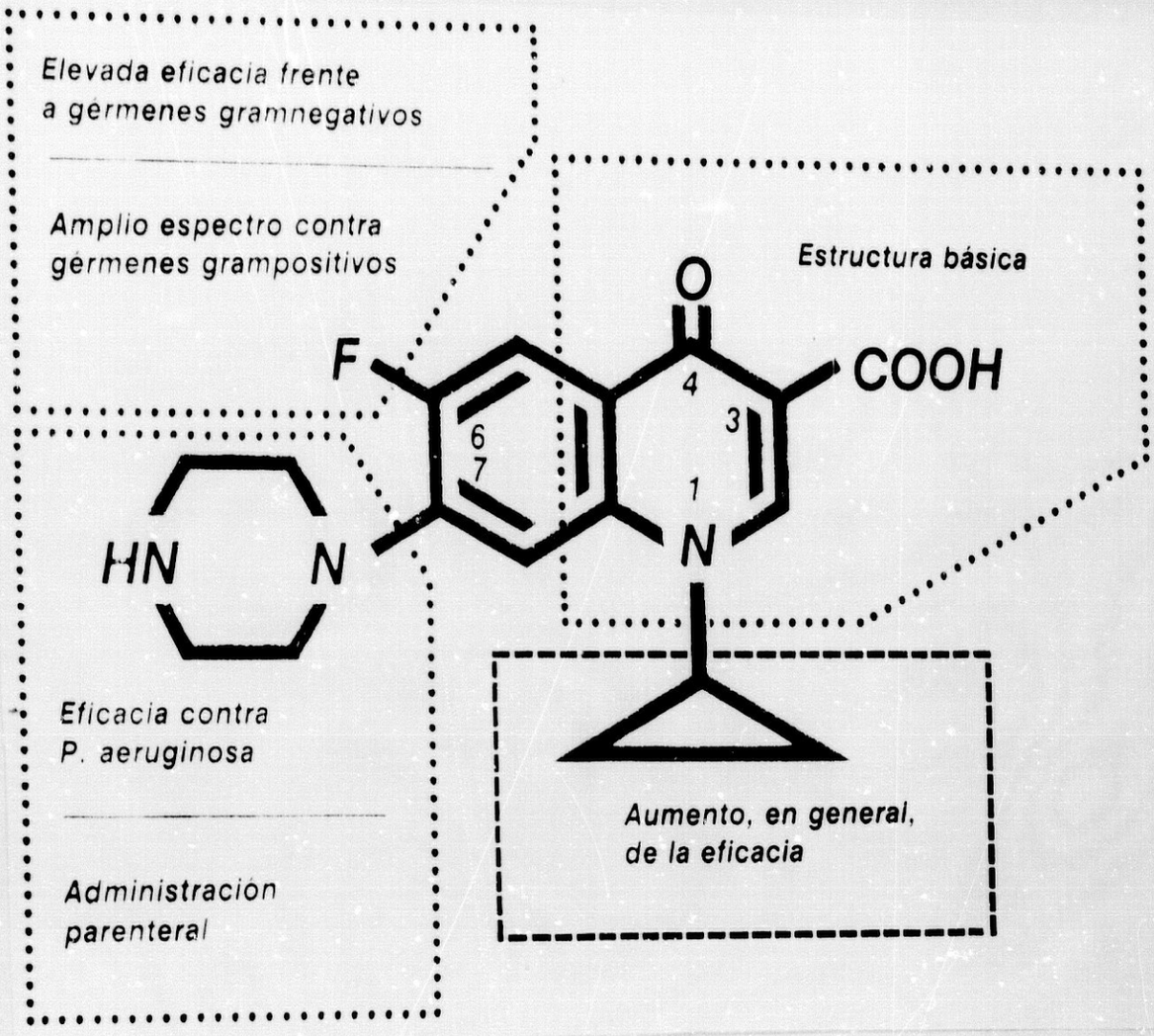


FIGURA 4. Relación estructura acción de las quinolonas.

Se acepta también la clasificación de las quinolonas en distintas generaciones, según el momento de su aparición en clínica y comercialización (HONORATO y col 1983):

a) Primera generación: Este grupo esta constituído por ácido nalidíxico, ac. oxolínico, ac. pipemídico, ac. piromídico y fluomequina entre otros. Desde el punto de vista farmacocinético su caracteristica principal es la rápida eliminación renal y, consecuencia de ello, las bajas concentraciones séricas que se alcanzan.

b) Segunda generación: En este grupo se encuentran ciprofloxacino, norfloxacino, fluoxacino, enoxacino, pefloxacino, ofloxacino y amifloxacino. Estructuralmente tienen en común el átomo de flúor en posición 6 del anillo central. La farmacocinética de este grupo le permite obtener niveles séricos más elevados, por lo que es posible utilizarlas en infecciones sistémicas.

c) Tercera generación: Su característica estructural es la presencia de otro átomo de flúor en posición 8, siendo pues las quinolonas difluoradas, en este grupo está lomefloxacino junto a otras moléculas en fase de experimentación.

1.3.- MECANISMO DE ACCION.

El mecanismo de acción de los derivados de la 4-quinolona es complejo y aún no está completamente dilucidado. El lugar de acción de estos compuestos son las topoisomerasas o girasas del ADN, específicamente la subunidad A de la topoisomerasa II, y algunos también actúan sobre la topoisomerasa II'. La inhibición de estas enzimas es la que provoca la muerte bacteriana (SMITH y LEWIN 1988).

Los estudios para dilucidar el mecanismo de acción íntimo de estos compuestos se han realizado especialmente en Escherichia coli. Un elemento básico para comprender dicho

mecanismo es el que el cromosoma bacteriano, de una longitud de 1300 micras, tiene que disponerse en el interior de una célula de tan solo 2 x 1 micras (Figura 5a). WORCEL (1974) estudió como se plegaba el cromosoma de Escherichia coli y encontró que contenía zonas organizadas especialmente que el denominó "enrrollamientos" o "dominios". Cada uno de estos tiene una longitud aproximada de 20 μm y está fijado sobre un núcleo de ARN (Figura 5c). La necesidad de espacio obliga a cada uno de estos dominios a irse condensando, dando lugar a los "dominios de superenrrollamiento" (Figura 5d). Como el cromosoma de Escherichia coli tiene una longitud de 1300 μm, contiene pues 65 de tales "dominios de superenrrollamiento". El "número de superenrrollamientos" de cada dominio es de unos 400 y sus espirales se enrrollan en sentido contrario a las helices del ADN, tratandose por tanto de un superenrrollamiento "negativo" (WANG 1974).

A comienzos de 1976 descubrieron CRUMPLIN y SMITH (1976) que la acción específica del ácido nalidíxico (Figura 1) consistía en que, durante la replicación del cromosoma de Escherichia coli, inducía un apelotonamiento anormal de los precursores de ADN de una sola hélice con un peso molecular de 18.8 x 106 daltons. Como el peso molecular de una cadena del cromosoma de Escherichia coli es de 1250 x 106 daltons, existen por tanto 66 de tales precursores cromosómicos por cromosoma. Lo que coincide prácticamente, con el número de "dominios de superenrrollamiento" de WORCEL (1974). SMITH y LEWIN (1988) dedujeron que el motivo para el apelotonamiento de estos

precursores tenía que consistir por tanto, en que el ácido nalidíxico impide de forma muy específica la formación del ADN cromosómico final (CRUMPLIN y SMITH 1976).

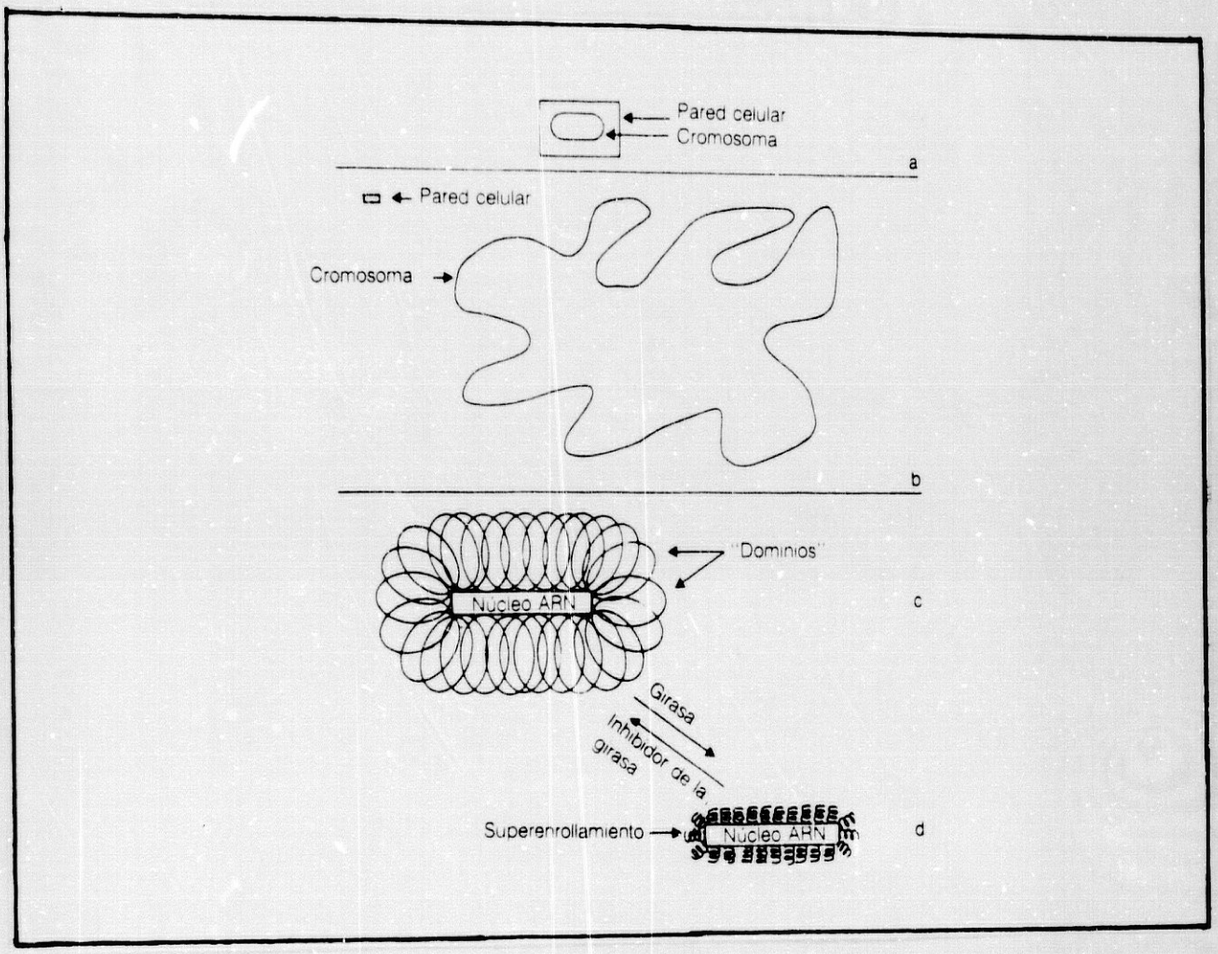


FIGURA 5.- Mecanismo de acción de las quinolonas.

Al comparar los resultados de estos autores parece deducirse que los dominios del cromosoma se superenrrollan unas 400 veces, esto sucede independientemente en cada dominio. Para lo cual, se abre pasajeramente la doble hélice del cromosoma, dominio a dominio, cortandose las dos hebras de forma escalonada.

Cuando se ha completado el "superenrrollamiento", los extremos de los dominios superenrrollados se unen de nuevo. La enzima responsable del cierre es inhibida específicamente por el ácido nalidíxico. La consecuencia de dicha inhibición es que: la forma fisiológica normal del cromosoma (Figura 5d) pasa a ser una forma de desarrollo más precario (Figura 5c), aumentando la necesidad de espacio para el ADN.

Los extremos o restos terminales de ADN que se originan, consecuencia del corte escalonado, poseen además una función señalizadora o de alarma induciendo la producción de exonucleasas, a las que ya hicieron alusión CRUMPLIN y SMITH (1975). Dichas exonucleasas rompen el ADN cromosómico en pequeños fragmentos, lo que significa la muerte de la bacteria.

Más tarde, en 1976, GELLERT y sus colaboradores (1976a) identificaron el enzima que presentaba actividad inductora de superenrrolamientos y responsable de los cortes en las cadenas de ADN, y que finalmente volvía a cerrar la doble hélice de ADN. La denominaron ADN-girasa o E. coli-topoisomerasa II. Esto vino a confirmar la existencia de tal enzima postulada por CRUMPLIN y SMITH (1976). Parecía ya por tanto bien establecida la molécula diana de las quinolonas, esta hipótesis se corroboró más tarde cuando GELLERT y col (1977) demostraron que este enzima era el punto de ataque responsable de la acción del ácido oxolínico.

La estructura de la E. coli-topoisomerasa II fué estudiada por HIGGINS y col. (1978), los cuales descubrieron que

está formada por 4 subunidades: 2 α-monómeros con un peso molecular de 105.000 daltons, y 2 ß-monómeros con un peso molecular de 95.000 daltons.

Las subunidades α son probablemente las responsables de los cortes del ADN en dominios aislados, y las subunidades ß de la inducción de los superenrollamientos negativos de dichos dominios (GELLERT y col 1976a). La energía necesaria para este subenrollamiento, provocado por las subunidades ß, se obtiene a partir de ATP, y los superenrollamientos negativos resultantes, vuelven a ser estabilizados de nuevo en el cromosoma por efecto del cierre de las subunidades α (GELLERT y col 1977). Se ha discutido si no sería la inducción del superenrollamiento negativo, provocada por las subunidades ß, el punto de ataque primario de los antibióicos coumermicina y novobiocina, no afines químicamente con las 4-quinolonas (GELLERT y col 1976b). Es conocido el sinergismo antibacteriano existente entre la novobiocina, sustancia que actúa principalmente sobre las subunidades ß, y el ácido nalidíxico, que en primera línea ataca a la subunidad α (CHAO 1978).

Las subunidades α de la ADN-girasa son las responsables de la inducción de cortes escalonados en las distintas hélices de ADN cromosómico bacteriano, y del nuevo cierre de los puntos de rotura (GELLERT y col 1977). GELLERT y col. (1977) describieron que la acción antibacteriana de los inhibidores de la girasa radicaba en impedir el cierre de estos puntos de rotura, debidos

a la acción de las subunidades α de la ADN-girasa. Aparte de esto pudo demostrarse que, en presencia de ácido nalidíxico (SUGINO y col 1977), y de ácido oxolínico (GELLERT y col 1977), aparece una unión covalente anormal entre el fragmento ADN y la ADN-girasa. MORRISON y COZZARELLI (1979) demostraron que los cortes producidos por las subunidades α de la ADN-girasa aparecen escalonados cada 4 pares de bases, y que el extremo 5' sobresale de la cadena. Las quinolonas enlazan precisamente el extremo 5' del ADN con la girasa mediante una unión o puente covalente anormal (MORRISON y COZZARELLI 1979).

Desde estos descubrimientos hechos en Escherichia coli, se han encontrado girasas similares también en Pseudomonas spp (MILLER y SCURLOCK 1983) y en Micrococcus spp (LIU y WANG 1978). La relativa resistencia de estos microorganismos al ácido nalidíxico se correlaciona con la ausencia de sensibilidad de sus girasas frente a esta sustancia.

Una de las características, quizá la más importante, que debe tener un buen antimicrobiano es su selectividad de acción. Aunque tanto las bacterias como las células humanas poseen como material genético ADN bicatenario, en su estructura existen diferencias fundamentales, las cuales son responsables de la selectividad de los inhibidores de las girasa.

Las bacterias contienen un sólo cromosoma, formado por una laxa combinación de 70% de ADN, 20% de ARN y 10% de proteína (ARN-polimerasa) (WORCEL 1974). El cromosoma bacteriano no está

envuelto por una membrana y se divide, como ya se ha dicho, en unos 65 dominios o zonas condensadas, consecuencia del superenrollamiento producido por la ADN-girasa. En cambio, la célula humana posee un núcleo especial, rodeado por una membrana, que contiene normalmente 46 cromosomas aislados. Cada cromosoma humano se compone de cromatina, sustancia compuesta en un 50% por pequeñas proteinas básicas, denominadas histonas, y otro 50% de ADN al que se une estrechamente. No existe duda alguna de que la cromatina humana está fuertemente condensada: el ADN de los 46 cromosomas del núcleo tiene una longitud aproximada de 189 cm y está en el interior de una célula de diámetro aproximado de 10 μm, y el del núcleo, naturalmente más pequeño (WHITE y col 1978). El mayor cromosoma humano contiene 8 cm de ADN, pero en el núcleo este tiene una longitud de 5 nm (WHITE y col 1978). La longitud del ADN humano se reduce al parecer en dos etapas: en una primera se unen las histonas al ADN, lo que hace que la longitud se reduzca unas seis veces aproximadamente, y en una segunda etapa se produce un mayor acortamiento aún, debido a un mecanismo poco conocido que parece radicar en interacciones existentes entre la cromatina y proteínas ácidas que se encuentran también en el núcleo.

Las células humanas contienen una topoisomerasa II, similar a la ADN-girasa bacteriana, y el ADN bicatenario se encuentra separado por dos cortes escalonados, alejados uno de otro 4 pares de bases, dejando libre el extremo 5' (LIU y col 1983, MILLER y col 1981). Al contrario que la ADN-girasa

bacteriana, la enzima humana no se compone de 4 sino de 2 subunidades, con un peso molecular cada una de 172.000 daltons. Cabe destacar que no posee, al parecer, actividad alguna de "superenrrollamiento". La importancia de este enzima está aún por aclarar, probablemente es necesaria para la primera etapa de la reducción longitudinal del ADN, y que podría tener lugar de la forma siguiente: existen 5 histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4); las 4 últimas se unen entre sí resultando un dímero (H2A:H2B) y un tetrámero (H3:H3:H4:H4) (WHITE y col 1978). La unión de un tetrámero con dos dímeros origina un complejo histónico, rodeado de ADN, dando lugar a un nucleosoma. Estos nucleosomas están separados unos de otros por cortos fragmentos de ADN, permaneciendo en contacto con la histona H1 restante (WHITE y col 1978).

Es posible que la topoisomerasa II humana realice este enrollamiento del ADN (Figura 6) al separar pasajeramente las hebras del ADN, permitiendole de esta manera rodear cada complejo histónico, y cerrar de nuevo los puntos de corte para formar un nucleosoma estable. En esto, la acción del enzima humano se diferencia de la acción de la ADN-girasa bacteriana, es por ello que no sorprende que la enzima humana sea mucho menos sensible a la acción de los inhibidores de la girasa (MILLER y col 1981).

La acción que los distintos componentes del grupo de las quinolonas ejercen sobre las bacterias es muy parecida, hecho que no debe de sorprender debido a la gran similitud estructural

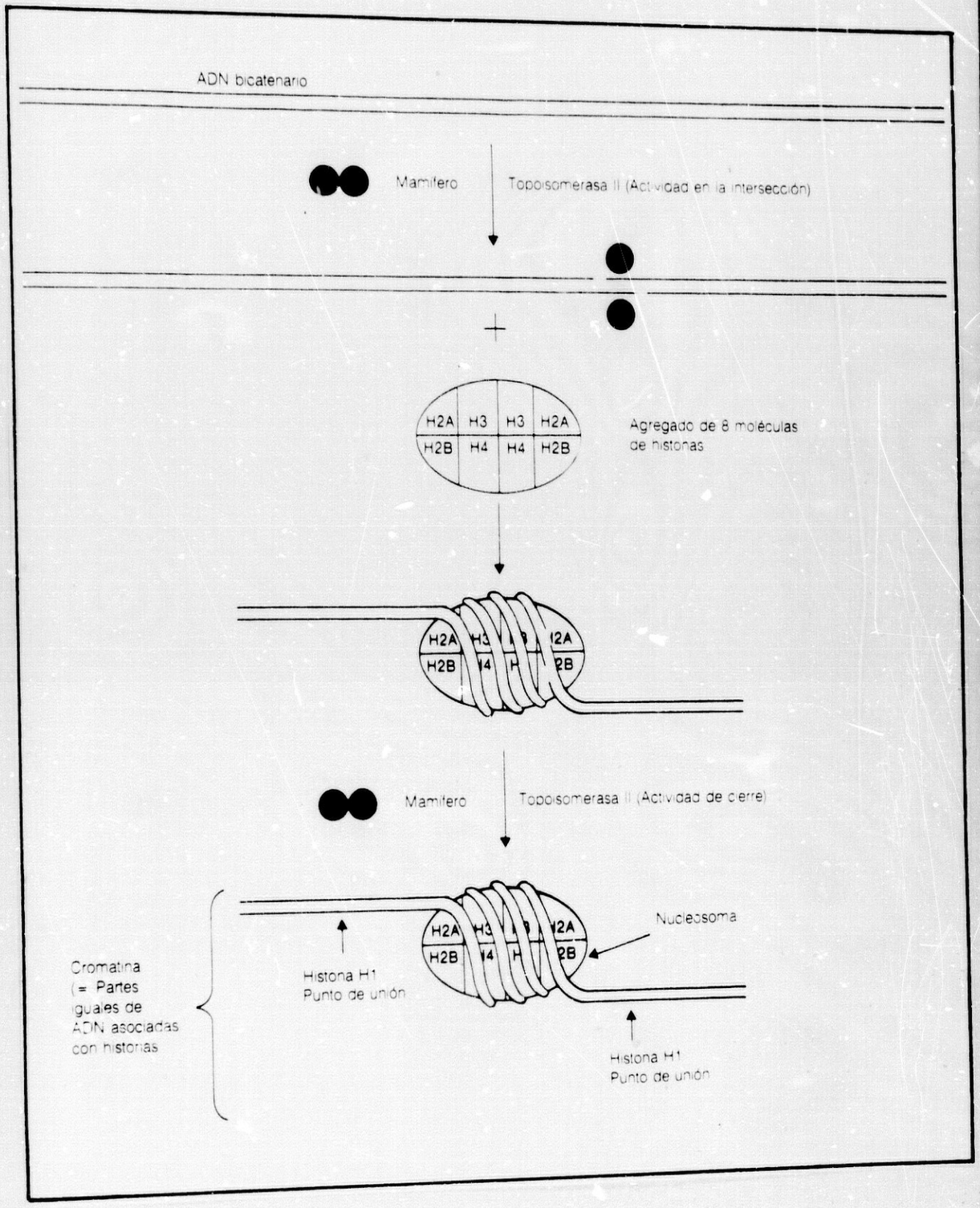


FIGURA 6.- Posible acción de la topoisomerasa II en la reducción del ADN humano.

entre estos compuestos, sin embargo, en función de su concentración existen diferencias cuantitativamente significativas en su actividad.

Los inhibidores de la girasa pertenecen al grupo de antimicrobianos de actividad bactericida. SMITH y LEWIN (1988) han descrito un comportamiento peculiar de las quinolonas, al estudiar el efecto de concentraciones crecientes de nalidíxico, norfloxacino, ofloxacino y ciprofloxacino, observando en los cuatro un efecto bifásico que consistía en que en pricipio, el poder bactericida aumenta al hacerlo la concentración y después, en una segunda fase, a partir de una determinada concentración, diferente para cada antimicrobiano, disminuye de forma progresiva el poder bactericida de estos compuestos, de manera que a concentraciones muy elevadas de antimicrobiano se detectan niveles notables de supervivencia. Este comportamiento podría compararse con el efecto Eagle descrito hace varias décadas con penicilina (EAGLE y MUSSELMAN 1948).

Sobre Escherichia coli KL-16, SMITH y LEWIN (1988) estudiaron el efecto bifásico de las quinolonas, describiendo que ácido nalidíxico alcanza su máximo efecto bactericida a 90 mcg/ml. CRUMPLIN y SMITH (1975) demostraron que esta primera fase se debe a que ácido nalidíxico origina una inhibición paulatina de la síntesis de ADN. A partir de la concentración señalada se produce un descenso de la actividad bactericida progresivo hasta la concentración 1500mcg/ml (concentración más elevada que

estudiaron). Estos autores sugieren que la segunda fase se debe a una creciente inhibición de la síntesis de ARN por las elevadas concentraciones de a. nalidíxico. Como ya se ha expuesto anteriormente existe un antagonismo entre la inhibición de la síntesis del ARN y la actividad de los inhibidores de la girasa (DEITZ y col 1966), por ello se justifica un descenso en la actividad bactericida en la segunda fase.

Ciprofloxacino muestra también este comportamiento bifásico, con un máximo efecto bactericida a 0.15 mcg/ml de concentración, a partir de la cual este efecto disminuye. Esta sustancia, sin embargo, difiere del ácido nalidíxico (SMITH y LEWIN 1988) en:

1.- El efecto bactericida de ciprofloxacino es más potente. La concentración bactericida máxima para a. nalidíxico es mucho mayor que para ciprofloxacino (600 veces), diferencia que concuerda también con la diferencia de sus CMI. Es de gran interés señalar que la concentración bactericida máxima de ciprofloxacino se alcanza fácilmente en suero en condiciones terapeúticas. Por el contrario la concentración bactericida máxima de ácido nalidíxico sólo se alcanza en orina, no así en suero.

2.- La capacidad bactericida máxima de ciprofloxacino también es superior a la de ácido nalidíxico, obteniendose con la concentración bactericida máxima de este último niveles de supervivencia mayores.

La ofloxacina y norfloxacina se comportan de modo intermedio a las dos inhibidores de la girasa descritos anteriormente.

El efecto bifásico de las quinolonas se ha observado en todos los componentes de esta familia, pero la segunda fase difiere cuantitativamente entre ofloxacino y ciprofloxacino, en las que su poder bactericida disminuye escasamente, y el resto de las quinolonas. Se han intentado explicar estas diferencias como una menor inhibición secundaria de la síntesis de ARN por ofloxacino y ciprofloxacino, o bien, un efecto bactericida de estos dos compuestos menos sensible a la acción antagónica de inhibición de la síntesis de ARN.

Para justificar esta hipótesis, investigaron el efecto de un inhibidor de la síntesis de ARN (rifampicina) sobre un cultivo que contenía concentraciones bactericidas máximas de las distintas quinolonas, comprobando que norfloxacino, oxolínico, roxoxacino, flumequina, pipemídico, cinoxacino, nalidíxico y piromídico dejan de ser bactericidas para actuar como bacteriostáticos; por el contrario ofloxacino y ciprofloxacino se siguen comportando como bactericidas, si bien, su efecto sufre un enlentecimiento, pero no en intensidad, siendo la tasa de mortalidad comparable a la descrita en ausencia de rifampicina (SMITH 1984).

Basándose en estas diferencias, se han postulado dos mecanismos de acción para las quinolonas: un mecanismo A común a

todas los inhibidores de la girasa antagonizable con la rifampicina (inhibidor de la síntesis de ARN), y el macanismo B (sólo lo presentan ofloxacino y ciprofloxacino) totalmente resistente a la acción antagónica de la rifampicina (SMITH y LEWIN 1988).

El efecto bactericida de ácido nalidíxico desaparece también cuando existe una inhibición de la síntesis proteica, como ocurre al añadir cloramfenicol (DEITZ 1966).

Por tanto, una inhibición de la síntesis proteica o de la síntesis de ARN reduce el efecto bactericida de todos los inhibidores de la girasa, si bien, ofloxacina y ciprofloxacina, al contar con un segundo mecanismo de acción, resistente a inhibidores de síntesis proteica y nucleica, el antagonismo sería menor al de las otras quinolonas (SMITH y LEWIN 1988).

1.4.- RESISTENCIAS

Uno de los problemas potenciales de cualquier antimicrobiano es la aparición de resistencias. El mecanismo de acción de las quinolonas, inhibiendo la enzima DNA girasa , ayuda a comprender la baja probabilidad de aparición de resistencia codificada por plásmidos (DNA extracromosómico); de forma que, a principios de la era de las quinolonas, se llegó a pensar que era imposible este tipo de resistencia codificada por plásmidos. Sin

embargo, si que son posibles mutaciones que induzcan la aparición de cepas resistentes.

Al estudiar las resistencia bacteriana a las quinolonas hemos de considerar tres aspectos:

1.- Selección de bacterias resistentes.

2.- Mecanismo de resistencia.

3.- Significación clínica.

1.- Selección de bacterias resistentes. PIFFARETTI y col. (1983) y WOLFSON y HOOPER (1985) describieron la aparición de resistencia de alto nivel a ácido nalidíxico con una frecuencia de 10-7 en diversas especies de bacilos Gram-negativos. Por el contrario, otros autores (SMITH 1986; FERNANDES y col 1987) no han encontrado este comportamiento en las nuevas quinolonas, con estos fármacos han descrito que la resistencia de un sólo escalón es de bajo nivel (1 a 10 veces la CMI), y que la frecuencia de aparición es de 100 a 1000 veces menor. No obstante, es posible seleccionar cepas muy resistentes a las nuevas quinolonas mediante exposiciones sucesivas a concentraciones progresivamente mayores de fármaco (CHIN y col 1986; HOOPER y col 1987; GOBERNADO y SANTOS 1988). Las cepas seleccionadas así, suelen tener resistencia cruzada a otras quinolonas, incluso a otros antimicrobianos no relacionados estructuralmente con estos (tetraciclina, cloranfenicol y cefoxitin).

2.- Mecanismo de resistencia. Se conocen dos tipos de mutaciones que inducen resistencia a las quinolonas. La primera afecta a los genes que codifican la enzima DNA girasa y se traduce en la producción de nuevas enzimas resistentes a estos fármacos. La segunda no afecta a los genes relacionados con la girasa y produce una disminución de la permeabilidad bacteriana que reduce la entrada de moléculas de fármaco.

a) La DNA girasa es un tetrámero formado por dos subunidades α codificadas por el gen gyr a y dos ß codificadas por el gen gyr b. La mutación se produce generalmente en el gen gyr a y raramente en el gen gyr b, induciendose una resistencia que afecta sólo a las quinolonas (GELLERT 1981; WOLFSON y HOOPER 1989). SUGINO y col. (1977) observaron que la girasa que contenía una subunidad α, aislada de bacterias con mutación en gen gyr a, solo se inhibe con concentraciones mucho mayores que las girasas con subunidad α procedente de una cepa susceptible. Esta mutación en gyr a también ha sido descrita con norfloxacino (HOOPER y col 1986), ofloxacinio (WOLFSON y col 1987) y ciprofloxacino (ROBILLARD y col 1988).

YOSHIDA y col. (1988) clonaron cuatro genes gyr a que codificaban resistencia y determinaron la secuencia de nucleótidos. En cada caso, el cambio de un sólo nucleótido encontrado se tradujo en el cambio de un sólo aminiácido en la subunidad α, estas cuatro mutaciones estaban agrupadas en las cercanías de la región del gen gyr a que codifica el amionoácido

tirosina del lugar activo de la enzima (HOROWITZ y WANG 1987), hecho que sugiere que la mutación afecta fuertemente a la interacción fármaco-proteína.

La mutación que afecta al gen gyr b es poco común, se han aislado dos casos de mutación, ambos seleccionados con ácido nalidíxico (INOUE y col 1987; YAMAGISHI y col 1986), uno de ellos, nalD induce resistencia a nuevas quinolonas, la otra, nalC, por el contrario produce hipersensibilidad a las nuevas quinolonas (SMITH 1984; YAMAGISHI y col 1986)

b) Cambios de permeabilidad. Es el segundo tipo de mutación que induce resistencias a las quinolonas, siedo esta de bajo nivel y afectando a otros fármacos no relacionados estructuralmente con las quinolonas. Los cuatro tipos de mutantes aislados, están asociados con un descenso de la unión de norfloxacino a la bacteria y a una menor proporción de la porina OmpF en la membrana externa de los microorganismos, lo cual se traduce en un menor paso de pequeñas moléculas hidrófilas (incluídas los derivados de la 4-quinolona) al espacio periplásmico (BEDARD y col 1987).

Hasta la fecha no se han descrito resistencias a quinolonas por destrucción o modificación de éstas. En 1977, BURMAN describió plásmidos que codificaban resistencia a ácido nalidíxico, hecho que no ha sido confirmado (MUNSHI y col 1987).

Las propias características de las quinolonas hacen

que este tipo de resistencias sea poco probable. En primer lugar, la resistencia a quinolonas debidas a mutaciones en gen gyr a o en las que causan un descenso en la permeabilidad, tienden a transmitirse como carácter recesivo (HANE y WOOD 1969; FOULDS 1976). En segundo lugar, las quinolonas reducen la transferencia de plásmidos conjugativos unas 100 veces (BURMAN 1977; NAKAMURA y col 1976). Por último, es conocida la capacidad de curage de plásmidos que poseen las quinolonas (WEISSER y WIEDEMANN 1985).

Existen diversos factores inespecíficos que incrementan la resistencia bacteriana a las quinolonas sin una base genética. Entre ellos está el incremento de la concentración de magnesio (SMITH y RATCLIFFE 1986); descenso del pH, presencia de orina (WOLFSON y HOOPER 1985) o heces (VAN SAENE 1986) e incremento del inóculo bacteriano (GOLDSTEIN y col 1987).

3.- Significación clínica. La aparición de resistencias durante la utilización clínica de las quinolonas, hoy día, es poco común. MILATOVIC y BRAVENY (1987) describieron resistencias en un 11.8% de las infecciones tratadas con monoterapia de ciprofloxacino.

En el estudio prospectivo de RYLANDER y col. (1987), comparando norfloxacino y trimetoprim-sulfametoxazol en el tratamiento de infecciones urinarias no complicadas, sólo hubo un ligero descenso de la susceptibilidad a esta quinolona en el 0.6% de los pacientes. Por otra parte, KRESKEN y WEIDEMANN (1988)

investigando la aparición de resistencias a quinolonas en distintos microrganismos, encontraron que la prevalencia del 4% de cepas resistentes a estos fármacos en Alemania no se alteró tras la introducción de norfloxacino y ofloxacino entre 1984-85, excepto para Pseudomonas aeruginosa, para la que hubo un incremento desde el 3% al 10% entre los años 1983-86.

La aparición de resistencias puede ser problemática en diversos patógenos, fundamentalmente P. aeruginosa (SCULLY y col 1986) y S. aureus (WOLFF y col 1985), acentuandose más aún en recinto hospitalario, de forma que MULLIGAN y col. (1987) describieron un incremento de resistencia, desde 13 a 37%, para P. aeruginosa y, desde 0 a 57%, para S. aureus meticilin resistentes.

La resistencia a quinolonas también se ha encontrado en otros microorganismos como Streptococcus pneumoniae (MAESEN y col 1985), Staphylococcus epidermidis (SMITH y col 1986b), Corynebacterium spp (MURPHY y FERGUSON 1987), Acinetobacter spp (ERON y col 1985), distintas enterobacterias (RYLANDER y col 1987; FOLLATH y col 1986; CHENG y col 1987) y otros microorganismos patógenos.

La aparición de superinfección por microorganismos resistentes a quinolonas es poco común, cuando ocurre es con patógenos frente a los cuales estos fármacos tienen una baja actividad. Así, se han descrito superinfecciones con P. aeruginosa (CHENG y col 1987), Streptococcus spp (SCULLY y col

1986; ERON y col 1985), Enterococcus spp (RYAN y col 1987), Bacillus spp (SCULLY y col 1986), levaduras (ERON y col 1985; RYAN y col 1987) y diversas enterobacterias (RYAN y col 1987; ESPOSITO y col 1988).

Para evitar la aparición de resistencias a quinolonas, WOLFSON y HOOPER (1989) sugieren que estos fármacos deben de utilizarse de una forma muy dirigida y en situaciones concretas; deben aparecer derivados más potentes y, por otra parte, deben alternarse las quinolonas con otros fármacos estructuralmente diferentes. Son pocos los estudios existentes que especifiquen recomendaciones para establecer regímenes de dosis que minimicen la aparición de resistencias.

Otra forma de intentar disminuir la aparición de resistencias sería la utilización de una terapia combinada. VAN DER AUWERA (1985), y MOODY y col. (1987) han descrito acción aditiva, incluso sinérgica y raramente antagónica, al combinar quinolonas y ß-lactámicos o aminoglucósidos. Los estudios llevados a cabo por MICHEA y col. (1986), y BAMBERGUER y col. (1987) con modelos de infección en animales, apuntan la supresión de las resistencias por medio del uso de una combinación de fármacos. Incluso, se ha descrito que dichas asociaciones evitan la reaparición de resistencias a los fármacos combinados con las quinolonas (THAUVIN y col 1988).

1.5.- ESPECTRO DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA, FARMACOCINETICA E INDICACIONES.

El espectro de acción de los inhibidores de la girasa es variado, según el componente al que nos refiramos. Podemos hacer dos grupos según la amplitud de los microorganismos sobre los que actúa:

1.- Activos, en principio, frente a bacilos Gram negativos de la familia Enterobacteriaceae e inactivos frente a Pseudomonas aeruginosa con escasa o nula actividad frente a cocos Gram-positivos. A este grupo pertenecen a. nalidíxico, piromídico, pipemídico, oxolínico y cinoxacino.

2.- Inhibidores de la girasa de amplio espectro. Este grupo lo forman los nuevos inhibidores de la girasa. Cabe destacar, tanto por sus indicaciones, en multitud de cuadros infecciosos, como por su gran actividad, ciprofloxacino. Estos antibacterianos en su espectro engloban, teóricamente, bacterias Gram-negativas (incluidas Pseudomonas spp, Serratia spp y Legionella spp) y cocos Gram-positivos (incluídos Enterococcus spp) y bacterias anaerobias (a excepción de enoxacino).

FARMACOCINETICA.

La tabla 1 muestra algunos de los parámetros farmacocinéticos más interesantes de las quinolonas más importantes.

1

antimicrobiano	niveles séricos (Dosis) (mcg/ml)	conc. urinaria máxima (mcg/ml)	vida media (horas)	unión proteinas (%)	% dosis eliminada orina (metab)	heces
A. nalidixico	20-40 (1000)	80-500	1.5	93	10 (86)	4
A. oxolinico	0.8-3.3 (750)	40-200	6	85	1.5 (70)	20
A. pipemidico	3 (400)	800	1.5	20	60	25
Cinoxacino	6 (250)	90-925	1.5	80	50-60 (20)	20
Enoxacino	1.2 2.2 4.1 (200) (400) (600)	350	4-6	20	50-60 (10-20)	
Norfloxacino	0.4 0.6 1.4 2.5 (100) (200) (400) (800)	180	3-4	15	30-50 (20)	
Ofloxacino	1.0 3.5 6.8 (100) (200) (600)	250	5-7	30	90	4
Pefloxacino	1.8 2.6 5.4 (200) (400) (600)	111	11-15	25	32 (27)	
Ciprofloxacino	0.8 1.5 2.8 4.2 (100) (250) (500) (750)	190	3-4	30	50-71 (13-18)	17-32

Los inhibidores de la girasa son fármacos que se absorben bien, y generalmente de forma rápida, cuando se administran por vía oral, oscilando el tiempo máximo entre 1-3 horas. Existen diferencias entre las distintas quinolonas en cuanto a velocidad y fracción de la dosis absorbida.

Es interesante señalar, que las constantes de absorción y eliminación son independientes de la dosis administrada, de tal forma que la Cmax y área bajo la curva es proporcional al incremento de la dosis (cinética de orden 1). Este comportamiento, sin embargo, se ha visto que cambia con dosis elevadas para norfloxacino y ciprofloxacino.

Se rigen por un modelo de cinética bicompartimental exceptuando a ciprofloxacino administrado por vía i.v. que se ajusta mejor a un modelo tricompartimental abierto (HONORATO y col 1988).

La unión a proteínas es relativamente baja en las nuevas quinolonas (15-30%) y elevada (incluso superior al 90%) para las antiguas.

La vida media es muy variada, oscilando entre 90 minutos (antiguas quinolonas) y las 15 horas de pefloxacino.

Los niveles séricos oscilan, dependiendo de la dosis administrada, entre 0.39 mg/l de norfloxacino y 40 mg/l de ácido nalidíxico.

La eliminación es fundamentalmente renal, tanto por filtración como por secreción activa tubular. La excepción es pefloxacino. El porcentaje de la dosis administrada que se elimina por la orina de forma inalterada es variable, al igual que la proporción metabolizada a nivel hepático. Algunos de los metabolitos de estos fármacos poseen actividad. Es interesante

resaltar que cierta proporción de la dosis (hasta el 32%) se elimina en heces.

INDICACIONES.

Las quinolonas de primera generación, estaban indicadas unicamente en el tratamiento de infecciones del tracto urinario, dado que su rápida eliminación renal únicamente originaba concentraciones eficaces del fármaco a este nivel.

Por el contrario, las quinolonas fluoradas tienen una aplicación clínica más amplia en virtud de las siguientes características:

1.- Marcado efecto antibacteriano y amplio espectro.

2.- Buena absorción por vía oral.

3.- Vida media prolongada permitiendo la administración cada 12 o 24 horas.

4.- Buena distribución en los diversos compartimentos orgánicos a concentraciones eficaces (orina, tracto digestivo, tejidos pulmonar, oseo, etc.)

Las indicaciones más frecuentes de las quinolonas fluoradas son las infecciones respiratorias, urinarias, intestinales, de transmisión sexual e infecciones sistémicas entre otras.

También se ha demostrado la utilidad de estos

compuestos en infecciones dérmicas producidas por Staphylococcus, infecciones mixtas de tejidos blandos producidas por aerobios Gram-negativos. Debido a las elevados niveles de fármaco que se consiguen en hueso, se han convertido en fármacos muy útiles en el tratamiento de osteomielitis (FONG y col 1986). Por otra parte, la facilidad con que atraviesan la barrera hematoencefálica permite el que puedan ser utilizados en infecciones del sistema nerviosos central (DOW y col 1986; STUBNER y col 1986). También se han descrito buenos resultados en el trtamiento de infecciones biliares con ofloxacino y ciprofloxacino.(HONORATO y col 1988).

CAPITULO SEGUNDO. ESTADO ACTUAL DE LOS PARAMETROS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN BACTERIAS AEROBIAS.

En la selección de un antimicrobiano para el tratamiento de procesos infecciosos intervienen varios factores:

1.- Conocimiento de la susceptibilidad "in vitro" del microorganismo infectante a los antimicrobianos.

2.- Relación de la susceptibilidad de la cepa con la de otros miembros de la misma especie.

3.- Propiedades farmacológicas y farmacocinéticas.

4.- Experiencia clínica previa.

5.- Naturaleza del proceso patológico.

6.- Estado de la inmunidad del huésped.

Los factores que se someten a medición directa en el laboratorio de microbiología son: la concentración de antimicrobiano necesaria para inhibir el crecimiento o matar al microorganismo "in vitro" y los niveles que alcanza el antimicrobiano en los líquidos corporales durante el tratamiento.

Existen distintas técnicas para determinar la susceptibilidad de un microorganismo a los agentes antimicrobianos. Los resultados obtenidos con las diversas técnicas están influenciados por una serie de factores como: inóculo bacteriano, tiempo y temperatura de incubación, pH, atmósfera y estabilidad del fármaco. Las diferencias de los componentes o del contenido iónico del medio pueden influir en los resulatdos de las pruebas. En las técnicas de difusión hay que tener en cuenta la velocidad de crecimiento del

microorganismo, la profundidad y la concentración del agar utilizado (THORNSBERRY Y SHERRIS 1985). Por esta razón es esencial trabajar con metodologías estandarizadas, pues sólo así podremos obtener una buena reproductibilidad (ERICSSON Y SHERRIS 1971; THORNSBERRY Y BAKER 1981)

El inóculo utilizado en las pruebas de susceptibilidad se obtiene a partir de varias colonias del microorganismo a estudiar. Así reducimos la posibilidad de seleccionar variantes derivadas de mutaciones por pérdida o segregantes de marcadores de resistencia al factor R. Los medios de cultivo que se utilicen deben de tener buena capacidad tamponante, reproductibilidad y pH fisiológico. Una cualidad que deben tener estas pruebas, es poder detectar cepas portadoras de determinantes de resistencia.

2.1.- TECNICAS PARA EL ESTUDIO DE SENSIBILIDAD. CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA.

Las pruebas de susceptibilidad que a continuación describimos son:

1.- Prueba de difusión.

2.- Pruebas de dilución: - en agar.

- en caldo:

a) macrodilución.

b) microdilución.

3.- Pruebas automatizadas.

2.1.1.- PRUEBA DE DIFUSION.

Este método ha sido aceptado por la Food and Drug Administration (FDA) (FEDERAL REGISTER 1972; 1973) y aceptado como estándar por el National Committee for Clincal Laboratory Standars (NCCLS) (NCCLS 1983).

Es el método más utilizado, se trata de una prueba cualitativa que clasifica a los microorganismos como sensibles, intermedios y resistentes.

Los antimicrobianos se aplican a las placas de prueba en forma de discos secos de papel de filtro. A partir de este momento, el disco absorbe agua del medio de agar disolviendose el antimicrobiano. Se produce así un gradiente de concentración, lo

que lleva consigo la difusión del antimicrobiano a favor de dicho gradiente (BARRY 1976) alrededor del disco. El microorganismo quedará expuesto a dicho gradiente, de forma que se inhibirá su crecimiento en el lugar donde la concentración de antimicrobiano sea la CMI.

Lectura e interpretación.

Existen unas normas de interpretación de esta prueba, así como unas tablas de estándares en las que vienen reflejados los diámetros de los halos de inhibición para considerar al microorganismo como resistente (R), sensible (S) o intermedio (I); dichas tablas están recogidas en el Documento de Octubre de 1983 (m2-T2) de la NCCLS (NCCLS 1983) y posteriores.

Es una técnica que se puede utilizar para multitud de antimicrobianos, por otra parte, es útil para microorganismos de crecimiento rápido (Enterobacterias, estafilococos, enterococos).

En casos de urgencia clínica puede utilizarse, con las naturales reservas, el material patológico como inóculo.

Las deficiencias de esta técnica son: no ser cuantitativa, no poder aplicarse a microorganismos de crecimiento lento e inexactitud para los antimicrobianos que tienen una mala difusión como las polimixinas (THORNSBERRY y SHERRIS 1985).

2.1.2.- PRUEBAS DE DILUCION.

Estas técnicas tienen la peculiaridad de cuantificar la suceptibilidad de las bacterias a los antimicrobianos.

Como ventaja frente a la anterior, estas pruebas no están influenciadas por la velocidad de crecimiento del microorganismo y no depende de la difusión del fármaco en el agar. Un inconveniente sería el no poder utilizarse esta metodología para estudio directo sobre el producto patológico. Por otra parte, su interpretación requiere mayores conocimientos de los distintos antibióticos, ya que los resultados se expresan cuantitativamente.

DILUCION EN AGAR.

Esta técnica utiliza diluciones seriadas del antimicrobiano, las cuales se adicionan al agar Muller-Hinton (medio recomendado para realización de estas pruebas) previamente fundido y a una temperatura de 45°C aproximadamente. Se mezcla bien y se extiende sobre una placa de Petri. Las concentraciones de antimicrobiano serán tales que nos permitan un rango desde 128 mcg/ml hasta una concentración mínima, que será diferente para cada antimicrobiano y que dependerá de la potencia de este.

. El método de dilución en agar permite estudiar simultáneamente la sensibilidad de muchas cepas.

Preparación del antimicrobiano.

La preparación de las diluciones del antimicrobiano se debe de hacer en el medio de cultivo que se va a utilizar para la prueba. Para ello, se parte de una solución concentrada del antimicrobiano y a partir de esta se preparan las diluciones.

Preparación del inóculo.

Se parte de 4-5 colonias, representativas de los microorganismos a estudiar, y se inoculan en un caldo ajustandose su turbidez al 0.5 de la escala de Mc. Farland (correspondiente a aproximadamente 5x107 ufc/ml de enterobacterias y 1-5x108 Pseudomonas). El inóculo también se puede ajustar espectrofotométricamente, así a una longitud de onda de 580 nm, 0.3 de densidad óptica equivale a aproximadamente 3x107 ufc/ml de enterobacterias.

La inoculación de las placas se realiza con un asa calibrada (1-2 mcl) o con el aparato de replicación descrito por STEERS y col. (1959).

Un vez inoculadas las placas se dejan reposar, antes de la incubación, hasta que el inóculo esté completamente absorbido. La incubación se realiza a 35°C durante 16-20 horas.

El control de la prueba se puede llevar a cabo inoculando una placa sin antimicrobiano en la cual se debe obtener un creciento homogéneo y semiconfluente. Por otra parte,

el control de calidad de esta prueba se haría inoculando cepas estándars, las cuales deben de presentar unos valores de CMI dentro de unos rangos indicados por los centros de referencia.

Lectura e interpretación.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada cepa sería la menor concentración de antibiótico que no produce crecimiento, o que produce una colonia discreta o un desarrollo apenas visible, en relación al control.

DILUCION EN CALDO.

La metodología empleada en este caso, es una variación de la técnica anteriormente descrita. En un principio, esta prueba se realizó en tubos con un volumen de 1ml, no se estandarizó hasta 1977, no obstante en 1971 el informe del Estudio Cooperativo Internacional describió con cierto detalle los métodos de dilución en agar y caldo (ERICSON Y SHERRIS 1971). El método de dilución en caldo allí descrito es el conocido hoy día como Macrodilución, el cual no ha tenido nunca una gran aceptación como sistema de rutina (ERICSON Y SHERRIS 1971; JONES Y EDSON 1982).

Cuando se empezó a utilizar la técnica de dilución en caldo de forma sistemática fué a partir de su adaptación como micrométodo (microdilución) (GAVAN Y TOWN 1970; MAC LOWRY Y MARSH 1968). Existe una tendencia actual a la utilización de la

microdilución en caldo y a un menor empleo de la dufusión en agar (BALOWS Y COL 1977; NCCLS 1983).

El medio de cultivo que se recomienda para los aerobios y anaerobios facultativos de desarrollo rápido es caldo Muller-Hinton suplementado con cationes Ca++ y Mg++, si bien algunos microorganismos pueden requerir un caldo más rico.

Preparación del inóculo.

a) Macrodilución. Se prepara un inóculo que contenga 105-106 ufc/ml. Para ello ajustamos la turbidez de una suspensión bacteriana, en fase exponencial de crecimiento, al 0.5 de la escala de Mc Farland o bien espectrofotométricamente, como se ha indicado anteriormente. Esta suspensión estandarizada se diluye al 1:200 obteniendose asi el inóculo deseado.

b) Microdilución. Al igual que para macrodilución, se estandariza al 0.5 de Mc Farland. Cuando se preparan las placas de microtiter con 50 mcl de suspensión bacteriana y otros 50 mcl de solución de antimicrobiano en medio de cultivo se siguen los pasos indicados en el apartado "a", el inóculo final será 5x105 ufc/ml. Otra forma de preparar el inóculo es la utilizada por sistemas semiautomatizados, que inoculan 1-5 mcl de la suspensión bacteriana estandarizada en los pocillos conteniendo 100 mcl. Para que el inóculo final sea de 5x105, el cultivo se estandariza a 5x107 ufc/ml, de manera que al dispensar 1mcl en el pocillo que contiene 100 mcl, se obtenga el inóculo deseado.

Tras la inoculación se incuban los tubos o placas 16-20 horas a 35°C.

Lectura e interpretación.

Una vez incubados los cultivos se examinan las placas desde abajo mediante un espejo, o desde arriba. La CMI se considera la menor concentración de fármaco frente a la cual el microorganismo no tiene un desarrollo visualizable, es decir, no hay turbidez ni botón en el fondo mayor de 2mm de diámetro. Para la valoración del crecimiento bacteriano se ha de comparar los pocillos con antimicrobiano con el control, que no lo lleva. En macrodilución la lectura se hace de forma similar.

Para el control se utilizan cepas de referencia que tengan su CMI cercana a la mitad de los límites de concentración ensayados. Como control de crecimiento de cada microorganismo se utiliza, en cada serie de diluciones, un tubo o pocillo sin antimicrobiano.

2.1.3.- PRUEBAS AUTOMATIZADAS.

Desde hace años se intenta automatizar el laboratorio de bacteriología. Distintas determinaciones son susceptibles de automatización, así, se han aplicado métodos de radiometría (DE BLANC y col 1972), microcalorimetría (BINFORD y col 1973), bioluminiscencia (GUTEKUNST 1977) e impedancia eléctrica (COLVIN

Y SHERRIS 1977) para la determinación de susceptibilidad bacteriana a antimicrobianos.

Los procedimientos que han sido evaluados y aprobados por la FDA, se basan en determinaciones ópticas de crecimiento bacteriano por transmisión de luz o dispersión de esta (THORNSBERRY 1985). Estos sistemas dan los resultados de forma cualitativa en tres niveles (resistencia, sensibilidad intermedia y sensibilidad) y/o cuantitativamente como CMI.

Algunos de estos sistemas se han limitado a automatizar métodos tradicionales de las pruebas de suceptibilidad (THORNSBERRY y BAKER 1981).

Entre los sistemas más empleados actualmente, y que han sido ampliamente evaluados por distintos autores (THORNSBERRY Y BAKER 1981; JOHNSON y col 1983), se encuentran Autobac I y Autobac MIC (General Diagnostics),y el MS-2 y Automicrobioc System (Vitek). Estos sistemas estan aprobados por la FDA.

2.2.- TECNICAS PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA.

Con las pruebas habituales de susceptibilidad se determina la concentración que inhibe el crecimiento bacteriano, es decir, determinamos actividad bacteriostática. Esto, en la prática, suele ser suficiente para que se establezca la terapia de un determinado proceso infeccioso.

Para los compuestos bactericidas puede ser a veces necesaria una evaluación cuantitativa del poder bactericida sobre un determinado microorganismo.

Existen principalmente tres métodos o técnicas para el estudio de la actividad bactericida de los antimicrobianos:

1.- Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB).
2.- Determinación del título bactericida del suero.
3.- Curva de letalidad o actividad bactericida en el tiempo.

Hasta el momento actual no se ha establecido ningún método estandarizado y de referencia para la determinación de estos parámetros, si bien su determinación es conocida desde hace varias decadas (SHOENKNECHT y col 1985).

2.2.1.- DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA BACTERICIDA.

Es la prueba más solicitada por el clínico por su fácil interpretación y relativamente cómoda determinación.

La definición de CMB no está del todo bien establecida, convencionalmente se expresa como la concentración de un antimicrobiano que reduce el inóculo o población incial un 99.9%.

La determinación de la CMB se lleva a cabo a partir del estudio de la CMI por dilución en caldo, preferiblemente macrodilución. Se basa en que la no presencia de turbidez en el medio no tiene por qué indicar ausencia de bacterias viables, hecho que se puede demostrar al hacer un subcultivo del caldo sin turbidez.

Es lógico pensar que factores tales como densidad y volumen del inóculo cultivado y volumen subcultivado en placa, son determinantes en los resultados obtenidos y reproductibilidad de éstos.

El medio recomendado es el mismo que en la determinación de la CMI por dilución en caldo, con las mismas recomendaciones en ella indicadas.

Preperación del inóculo.

Se prepara un inóculo de aproximadamnte 5x106 ufc/ml de la forma señalada anteriormente.

Una vez incubados los tubos de caldo con las diluciones de antimicrobiano 20 horas a 35°C, se agitan y se vuelven a incubar 4 horas, tras las cuales se vuelven a agitar y se realizan los subcultivos en medios ricos que permitan el crecimiento de los microorganismos en estudio. El subcultivo se realiza con 0.1 ml del caldo de los tubos que no presentan turbidez, inoculando sobre el agar y extendiendo con ayuda de un asa de vidrio. Los recuentos se hacen tras una incubación de 24-48 horas (según el microorganismo) a 35°C.

Lectura e interpretación.

La CMB será la menor concentración del fármaco que impide el desarrollo y reduce la población 1000 veces, o lo que es igual un 99.9%. Como se utiliza un inóculo inicial conocido (5x106 ufc/ml) teniendo en cuenta el volumen subcultivado podemos conocer tras el recuento las bacterias viables por mililitro que quedaban en el caldo y establecer cual es la CMB.

2.2.2.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL SUERO.

Existen varias técnicas para detectar la actividad bactericida del suero. Originalmente esta determinación fué descrita por SCHLICHTER y col.(1947; 1949) como método de estudio de la actividad bacteriostática. La adaptación para actividad bactericida vino más tarde, condicionado por las dificultades que

planteaba objetivar ausencia de crecimiento en el suero (debido a su turbidez). A pesar de que en un principio no se le dió mucho valor a esta determinación, trabajos recientes señalan su gran interés, sobre todo para análisis de los tratamiento en enfermos inmunodeprimidos (KLASTERSKY y col 1974; SCULIER Y KLASTERSKY 1984).

Varias técnicas han sido estandarizadas por determinados laboratorios (ANHALT y col 1980; WASHINGTON 1981), en general se basan en diluir el suero del sujeto bajo tratamiento hasta un título de por lo menos 1/64, para ello se utiliza caldo Muller-Hinton de forma que se consiga un volumen final de 1ml. Lo ponemos en contacto con 0.1 ml de inóculo bacteriano de 5x106ufc/ml. Los recuentos se realizan tras la incubación de 18-24 horas a 35°C por medio de subcultivos, de forma análoga a los descritos en la determinación de la CMB.

El control en esta prueba será un tubo con Muller-Hinton e inóculo pero sin suero.

La lectura se realiza como se indicó en la CMB.

2.2.3.- ACTIVIDAD BACTERICIDA EN EL TIEMPO.

El estudio de la actividad bactericida en el tiempo o curva de letalidad es uno de los métodos más utilizados para la evaluación y comparación de los agentes antimicrobianos, sólo en

casos excepcionales se utiliza para apoyo de una terapia individualizada (VOLGEMAN y CRAIG 1986; SCHOENKNECHT y col 1985).

Este parámetro, frente a la CMI que sólo informa de la inhibición de un microorganismo por el fármaco, nos ofrece una visión dinámica de la actividad del antimicrobiano en el transcurso del tiempo.

VOLGEMAN y CRAIG (1986) clasifican los antimicrobianos, según su cinética de letalidad, en tres categorías :

- marcada dependencia con la concentración.
- baja dependencia con la concentración.
- predominantemente bacteriostáticos.

EAGLE y MUSSELMAN (1948) describieron en penicilina, antimicrobiano perteneciente al segundo grupo, un efecto paradógico que consistía en que al aumentar la concentración entre 50 y 500 veces la CMI no se producía un incremento, sino una reducción de la actividad bactericida ; hecho que sólo se ha observado en cocos Gram-positivos y que no se han descrito in "vivo" (VOLGEMAN y CRAIG 1986). Un efecto similar se ha visto al estudiar el efecto de concentraciones crecientes de inolonas sobre Echerichia coli (SMITH y LEWIN 1988), que afecta de distinta forma a los diferentes compuestos del grupo estudiados.

Los aminoglucósidos son un ejemplo clásico del grupo

1, han sido estudiados "in vitro" (VOLGEMAN y CRAIG 1986) e "in vivo" (GERBER y col 1983; BLASSER y col 1985) , comportándose en ambas situaciones muy dependientes actividad bactericida y concentración, de forma que altas concentraciones de fármaco iban asociadas con una elevada y rápida actividad bactericida.

La mayoría de los estudios realizados con B-lactámicos muestran una pequeña dependencia de la actividad bactericida con la concentración (NISHIDA y col 1978; GRASO y col 1978; GERBER y col 1984), en estos compuestos se incrementa la actividad al aumentar la concentración hasta 5-10 veces la CMI, por encima de estos niveles no se incrementa la misma significativamente (VOLGEMAN y CRAIG 1986). Algunos autores han descrito en cefalosporinas incrementos de la actividad bactericida en un mayor rango de concentraciones al señalado anteriormente (KUNST y MATTIE 1978; GERBER y col 1984).

La actividad bactericida de imipenem se muestra más dependiente de la concentración que los demás ß-lactámicos, así YOURASSOWSKY y col. (1983) han descrito que pequeñas exposiciones a altas concentraciones son más efectivas que largos periodos de exposición a niveles más moderados de fármaco.

Eritromicina, cloramfenicol y tetraciclina presentan, al estudiar sus curvas de letalidad un comportamiento principalmente bacteriostático con la mayoría de los microorganismos; sólo ejercen una ligera actividad bactericida, más lenta a la observada con ß-lactámicos, y con

escasísima dependencia con la concentración (VOLGEMAN y CRAIG 1986). Sobre otros antimicrobianos los datos son limitados e incompletos.

La técnica para la determinación de la actividad bactericida en el tiempo es relativamente simple, consiste en exponer un cultivo estandarizado del microorganismo a una determinada concentración de antimicrobiano, realizando recuentos de bacterias viables en el momento de la exposición y en el transcurso de esta (MINGUEZ y col 1988; BAQUERO y col 1986). Como control se utiliza un cultivo no expuesto al fármaco. Estos estudios se pueden complicar más cuando se desea conocer el efecto de niveles fluctuantes de antimicrobiano (simulando cinéticas de eliminación fisiológicas). La determinación de la actividad bactericida se puede hacer "in vivo", por medio de un muestreo repetido del fluído biológico infectado (sangre, líquido cefalorraquídeo, etc.) o por medio de recuentos bacterianos en tejido infectado (VOLGEMAN y CRAIG 1986).

Para la cuantificación de este efecto se traza la denominada curva de letalidad, representación gráfica del número de bacterias viables o supervivientes en el eje de ordenadas frente al tiempo de exposición (eje de abcisas). De igual forma se representa el control (no expuesto).

La actividad o efecto bactericida (EB) se define como la diferencia de bacterias viables entre cultivo control y cultivo expuesto, refiriéndose al momento en que se determinó.

2.3.- EFECTO POSTANTIBIOTICO (EPA).

El retraso en el crecimiento de microorganismos que han sido previamente expuestos, durante cortos periodos de tiempo, a la acción de los antimicrobianos es conocido desde el descubrimiento de los primeros antibióticos. BIGGER en 1944 (1944) describió un retraso en la aparición de turbidez tras la adición de penicilinasa en cultivos de Staphylococcus y Streptococcus expuestos previamente a penicilina G.

Años más tarde, otros autores (PARKER y MARSH 1946; PARKER y LUSE 1948) demostraron que estafilococos expuestos a penicilina entre 5-30 minutos y transferidos a un medio de cultivo sin antimicrobiano, no alcanzaban una velocidad de crecimiento normal hasta pasadas aproximadamente 1 a 3 horas, según el tiempo de la exposición previa. Este efecto sobre el crecimiento de los microorganismos fué confirmado "in vivo" e "in vitro" por EAGLE y col. (EAGLE 1949; EAGLE y MUSSELMAN 1949; EAGLE y col 1950a).

A pesar de que estos estudios se iniciaron hace varias décadas, fueron abandonados hasta la pasada en la que se comenzaron a ampliar los grupos de bacterias en estudio a Gram-negativas y los antimicrobianos a fámacos más modernos.

En 1977, MC DONALD y col. (1977) utilizaron por primera vez el término "efecto postantibiótico" (EPA) para

describir el periodo de recuperación que necesitaban las bacterias, previamente expuestas a un antimicrobiano, para restaurar su normal crecimiento. Con este término intentaron enfatizar que el efecto se debía a una previa exposición al antimicrobiano, y no a la persistencia de concentraciones subinhibitorias de éste.

A pesar de que en los últimos 12 años se han publicado diversos trabajos sobre el efecto postantibiótico, son varios los autores (CRAIG y GUDMUNSON 1986; MINGUEZ y col 1988) que insisten en animar a los demás investigadores a incluir estos estudios en las líneas de investigación sobre la actividad de los numerosos antibióticos existentes, ya que los conocimientos sobre el efecto postantibiótico están lejos de haberse completado.

Existe una variedad de métodos "in vitro" para la determinación del EPA. Todas las técnicas se basan en la determinación de la curva de crecimiento de microorganismos tras la eliminación de un antibiótico, al que previamente han estado expuestos. La mayoría de los autores han utilizado una eliminación rápida del antibiótico por medio de varios lavados, dilución o inactivación enzimática del antibiótico (derivados de la penicilina).

Otros autores utilizan modelos más complicados, simulando una la eliminación "in vivo" del antibiótico con cinética de orden 1 (BERGAN y CARLSEN 1980; MURAKAWA y col 1980).

2.3.1.- FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE EL EFECTO POSTANTIBIOTICO.

En la tabla 2 se muestran los principales factores que influyen en la presencia y magnitud del efecto postantibiótico. Los más importantes y mejor estudiados son el tipo de microorganismo y de antimicrobiano . El tiempo de exposición y concentración están relacionados de forma directa con la duración del EPA (CRAIG y GUDMUNSON 1986; CHIN y NEU 1987; MINGUEZ y col 1988). Otros factores son menos conocidos, aunque no por ello menos interesantes, así, el pH del medio, el tamaño del inóculo y la fase de crecimiento en que se encuentran las bacterias en el momento de la exposición parace que juegan un papel importante en el desarrollo de este efecto (BAQUERO y col 1986; CHIN y NEU 1987; FUUSTERD 1987a).

TABLA 2. Factores que influyen el EPA.

Tipo de microorganismo	Otros: Inóculo
Tipo de antimicrobiano	Medio de cultivo
Concentración de antimicrobiano	Fase de crecimiento
Tiempo de exposición	Agitación
pH del medio	Asociación de antimicrobianos

Tipo de microorganismo y antimicrobiano.

El EPA se ha descrito para una gran variedad de bacterias, incluso levaduras, con otros tantos antimicrobianos y antifúngicos (MC DONALD y col 1976; WILSON y ROLINSON 1979; BUSTAMANCE y col 1984; VOLGEMAN y CRAIG 1985). La existencia o no de tal efecto depende de la pareja microorganismo-antimicrobiano. En principio, cabe pensar que este fenómeno lo pueden presentar todos los antimicrobianos, aunque ésto no se puede afirmar categóricamente ya que estos estudios se han llevado sólo sobre un limitado número de microorganismos y antibióticos.

EAGLE y MUSSELMAN (1949) estudiaron el EPA de penicilina G sobre Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus de los grupos A, B y viridans, Streptococcus pneumoniae y Streptococcus faecalis, describiendo en todos los casos la existencia de tal efecto. Posteriormente, otros autores estudiaron varios ß-lactámicos y otros antibióticos frente a bacterias Gram-positivas, comprobando que en todos se producía un retraso en el crecimiento (MC DONALD y col 1977; SHAH 1981; KITZIS y col 1984; MINGUEZ y col 1989a)

La duración del EPA de 21 antibióticos sobre Staphylococcus aureus ATCC 6538P se muestra en la tabla 3 . De estos datos cabe destacar que todos los antimicrobianos ejercen un notable EPA (con la única excepción de gentamicina) que es

superior en el caso de los agentes no ß-lactámicos. Por otra parte, se observa una uniformidad en la magnitud de dicho efecto, situación, que como se expondrá más adelante, no ocurre en las bacterias Gram-negativas.

TABLA 3 . EFECTO POSTANTIBIOTICO DE 22 ANTIMICROBIANOS SOBRE Staphylococcus aureus ATCC 6538P EXPUESTO DURANTE 2 HORAS A CONCENTRACIONES 4-5 VECES LA CMI.

Parte I

Antimicrobiano	Concentración (mcg/ml)	EPA (horas)
ß-lactámicos		
Penicilina G	0.05	1.5
Ampicilina	0.5	1.7
Cloxacilina	0.5	1.6
Dicloxacilina	0.5	1.8
Nafcilina	0.5	1.7
Meticilina	10.0	1.9
Cefalotina	1.0	1.5
Cefamandol	1.0	1.4
Cefotaxima	4.0	1.4
Cefoperazona	4.0	1.6
Ceftriaxona	4.0	0.9
Moxalactam	20.0	1.2
Imipenem	0.2	2.6

Parte II

Otros		
Vancomicina	2.0	2.2
Eritromicina	0.5	3.1
Clindamicina	0.5	2.9
Tetraciclina	0.5	2.4
Cloramfenicol	10.0	2.1
Gentamicina	5.0	0.3
Rifampicina	0.025	2.8
Trimetroprim	2.0	0.2-2.4a
Ciprofloxacino	0.5	2.0

atimidina eliminada por fosforilación.

Tomada de CRAIG y GUDMUNSON (1986).

PARKER y LUSE (1948) estudiaron 22 cepas de Staphylococcus aureus expuestas a penicilina, sólo en un caso en que la cepa era resistente, no se produjo EPA, resultados similares obtuvieron más tarde CRAIG y GUDMUNSON (1986) con el mismo microorganismo expuesto a dicloxacilina, eritromicina y rifampicina.

KUENZI y col. (1987) estudiaron el EPA de roxitromicina, eritromicina y clindamicina sobre cocos Gram-

positivos (Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae y Staphylococcus aureus), encontrando para los tres antibióticos efectos similares en iguales condiciones de estudio.

Las quinolonas han sido muy poco estudiadas, ciprofloxacino ejerce EPA sobre Staphylococcus aureus (CRAIG y GUDMUNSON 1986; CHIN y NEU 1987; FUUSTERD 1987b) y no sobre Enterococcus faecalis (CHIN y NEU 1987). Recientemente MINGUEZ y col. (1989a) han observado efecto postantibiótico tras la exposición de E. coli y S. aureus a ofloxacino.

En contraste con los comportamientos encontrados al estudiar cocos Gram-positivos, existen grandes diferencias en los EPA's de bacilos Gram-negativos. En las tablas 4 y 5 se muestran los efectos de 13 antimicrobianos sobre cepas estándar de Escherichia coli y Pseudomonas aeruginosa. Mientras los inhibidores de síntesis proteica y de ácidos nucleicos pruducen efectos entre 1.2-4.2 horas, no producen o son negativos los EPAs de ß-lactámicos y trimetroprim.

TABLA 4. EFECTO POSTANTIBIOTICO DE 13 ANTIMICROBIANOS SOBRE *Escherichia coli* ATCC 25922 EXPUESTO UNA HORA A CONCENTRACIONES 4-5 VECES LA CMI.

Antimicrobiano	Concentracion (mcg/ml)	EPA (horas)
ß-lactámicos		
Ampicilina	16.0	0.1
Cefamandol	2.0	-0.2
Cefotaxima	0.5	0.2
Cefoperazona	0.5	0.1
Moxalactam	0.5	0.2
Imipenem	0.8	0.0
Otros		
Gentamicina	2.0	1.8
Tobramicina	4.0	1.2
Tetraciclina	4.0	3.2
Cloramfenicol	16.0	1.8
Rifampicina	16.0	4.2
Trimetroprim	2.0	0.1
Ciprofloxacino	0.03	2.1

Tomado de CRAIG y GUDMUNSON (1986).

TABLA 5. EFECTO POSTANTIBIOTICO DE 13 ANTIMICROBIANOS SOBRE *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 EXPUESTO UNA HORA A CONCENTRACIONES 4-5 VECES LA CMI.

Antimicrobiano	Concentración (mcg/ml)	EPA (horas)
ß-lactámicos		
Carbenicilina	128	-0.2
Ticarcilina	64	-0.1
Piperacilina	16	-0.2
Cefotaxima	64	-0.3
Cefoperazona	32	-0.4
Moxalactam	64	-0.3
Imipenem	8	1.5
Otros		
Gentamicina	4	2.2
Tobramicina	2	2.1
Amicacina	8	2.0
Netilmicina	4	2.3
Ciprofloxacino	4	2.4

Tomado de CRAIG y GUDMUNSON (1986).

Resultados similares han sido observados con aislados clínicos de Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa y Haemophilus influenzae (BUNDTZEN y col 1981; GERBER y GRAIG 1981; BAQUERO y col 1986; CHIN y NEU 1987).

KUENZI y col (1987) observan EPA en roxitromicina, eritromicina y clindamicina sobre Haemophilus influenzae forzando las condiciones de estudio (concentración y tiempo de exposición), en comparación con cocos Gram-positivos.

El único derivado β-lactámico en el que se ha observado EPA es imipenem, tanto sobre Escherichia coli (BAQUERO y col 1986; CRAIG y GUDMUNSON 1986) como sobre Pseudomonas aeruginosa (BUSTAMANCE y col 1984; ODENHOLT y col 1989).

El comportamiento tan desigual de β-lactámicos e inhibidores de síntesis preteica y ribonucleica, en relación al EPA, parece ser que se produce también en los bacilos anaerobios Gram-negativos según observaciones de CRAIG y GUDMUNSON (1986), los cuales no detectan EPA con cefoxitina y si (2-4 horas) con clindamicina sobre Bacteroides fragilis.

Los antifúngicos también son capaces de retrasar el crecimiento de levaduras patógenas (TURNIDGE y col 1982). CRAIG y GUDMUNSON (1986) investigaron el efecto de anfotericina B, 5-fluocitosina, miconazol y ketoconazol frente a diversas cepas de Candida spp y Criptococcus neoformans, observando que los dos primeros agentes, tras dos horas de exposición a 4-6 veces la

CMI, ejercían un prolongado EPA (1.1-10.6 horas), no ocurría igual con miconazol y ketoconazol, con los que no se producía o era de poca duración.

En cuanto a los antituberculosos, son muy pocos los datos documentados bibliográficamente, en ellos cabe destacar el prolongado efecto (aproximadamente 2 días) tras 2 horas de exposición de Mycobacterium tuberculosis a isoniazida (BEGGS y JENNE 1969; CRAIG y GUDMUNSON 1986).

Concentración de antimicrobiano.

El primer investigador que estudió la influencia de la concentración del antimicrobiano sobre el efecto postantibiótico fue EAGLE (1949), sus estudios con penicilina G, sobre varios cocos Gram-positivos, demostraron que el EPA sólo se observaba con concentraciones altas que eran letales para dichos microorganismos. La duración del EPA aumentaba al elevar la concentración, pero hasta un nivel determinado sobre el cual ya no iban unidos el aumento de concentración y efecto. Otros autores (WILSON y ROLINSON 1979) observaron ésto con Staphylococcus aureus expuesto a penicilina G y ampicilina a 10 veces su CMI.

Esta relación concentración-EPA también se describió para eritromicina, trimetroprim y rifampicina (CRAIG y GUDMUNSON 1986), en esta última existía dependencia hasta concentraciones

de 200 veces la CMI, utilizando la cepa ATCC 6538P de Staphylococcus aureus.

En Escherichia coli, expuesto a distintos inhibidores de síntesis de ácido ribonucleico, también se observó un máximo en el efecto de la concentración sobre el EPA a partir del cual no aumentaba este último (CRAIG y GUDMUNSON 1986; CHIN y NEU 1987).

Trimetroprim y los ß-lactámicos (excepto imipenem) no producían efectos significativos hasta alcanzar concentraciones 8-32 veces la CMI del microorganismo en cuestión (SHIMADA y KATO 1976; GERBER y CRAIG 1981).

CRAIG y GUDMUNSON (1986) describieron un EPA aparentemente negativo al ensayar concentraciones bajas (aunque siempre suprainhibitorias) de ß-lactámicos frente a bacilos Gram-negativos, era debido a un aumento de microorganismos durante la primera hora tras la retirada del fármaco. Este hecho se justificó basandose en las formas filamentosas que inducen los ß-lactámicos durante su acción, las cuales, al ponerse en medio adecuado sin antimicrobiano, se dividen más y más rápidamente que un cultivo control sin exposición previa al fármaco. BAQUERO y col (1986) observaron un comportamiento similar de cefotaxima y piperacilina frente a bacilos Gram-negativos.

Tiempo de exposición.

El tiempo de exposición al antimicrobiano influye notablemente sobre la duración del efcto postantibiótico (BAQUERO y col 1986; CRAIG y GUDMUNSON 1986; CHIN y NEU 1987). Así, al aumentar el tiempo de exposición también lo hace dicho efecto, hasta un nivel en el cual se produce un estabilidad o meseta. El tiempo de exposición tras el cual se llega a esta meseta, en la que no van unidos aumentos de exposición con aumentos significativos de efecto, es distinto para cada pareja microorganismo-antimicrobiano. Para la mayoría de estas parejas se situa entre 2 y 8 horas de exposición en microorganismos Gram-positivos (EAGLE y MUSSELMAN 1949; CRAIG y GUDMUNSON 1986). Los estudios sobre flora Gram-negativa son más limitados y parece que sean necesarios menores periodos de exposición para obtener un máximo efecto (MC DONALD y col 1976).

CRAIG y GUDMUNSON (1986) observaron en Escherichia coli, expuesto a rifampicina, que reduciendo a la mitad el tiempo de exposición y duplicando la concentración se mantenía el EPA sin variaciones significativas, esto sugiere que concentración y tiempo de exposición inciden de igual forma sobre el EPA.

pH del medio.

El pH es un factor de los que se suponía una clara relación con el EPA pero escasamente estudiado (CRAIG y GUDMUNSON

1986). CHIN y NEU (1987) han realizado estudios del EPA de ciprofloxacino a distintos pH (7.4 y 5.5), observando que el efecto disminuye en pH ácido para diversos microorganismos Gram-negativos. Al analizar en profundidad estos datos, hemos de tener en cuenta como modifica el pH la sensibilidad de los microorganismos (CMI), la cual normalmente disminuye al alejarnos de la neutralidad, para, de esta forma separar la influencia del pH sobre el EPA del aumento de la resistencia del microorganismo al antibiótico.

Tamaño del inóculo.

El número de bacterias viables existentes en el momento de la exposición al antimicrobiano, lo describieron EAGLE y MUSSELMAN (1949) como un factor que influía en el EPA de penicilina y eritromicina sobre Staphylococcus aureus, estos autores utilizaron inóculos de 1x103 y 3x107 ufc/ml (unidades formadoras de colonias por mililitro) describiendo un ligero descenso del EPA al aumentar el inóculo. MC DONALD y col. (1981) tambien señalaron similar descenso en sus trabajos.

Recientemente, otros autores han ampliado los estudios sobre este factor en cepas de Escherichia coli expuestas a ampicilina, ciprofloxacino, tobramicina (RESCOTT y col 1988), imipenem, ceftazidima, cefotaxima, piperacilina y gentamicina (BAQUERO y col 1986). Los resultados que obtuvieron venían a corroborar los de EAGLE y MUSSELMAN (1949). El EPA de tobramicina

fué el que se mostró más dependiente del inóculo (RESCOTT y col 1988).

Fase de crecimiento.

Los estudios del EPA se llevan a cabo, de forma sistemática, a partir de cultivos que se encuentran en fase logarítmica de crecimiento en el momento de la exposición al antimicrobiano. Es por ello, que éste es uno de los factores menos analizados, aunque varios autores han descrito efectos similares tanto al partir de cultivos en fase logarítmica como en fase estacionaria de Staphylococcus aureus (CRAIG y GUDMUNSON 1986) y Pseudomonas aeruginosa (GERBER y col 1982), expuestos a penicilina y gentamicina respectivamente.

Agitación.

La mayoría de los autores no indican en sus trabajos si el cultivo, durante el ensayo, estaba sometido a algún tipo de agitación o no. CRAIG y GUDMUNSON (1986) los hacen siempre en agitación. WILSON y ROLINSON (1979) al estudiar el EPA de penicilina G sobre Staphylococcus aureus no observan diferencias significativas entre los resultados obtenidos en agitación y aquellos en que el medio se mantenía en reposo. Sin embargo, LEE y col. (1982) detectan un mayor EPA en ampicilina sobre un cultivo de Escherichia coli en agitación respecto al mismo en

reposo. Estos estudios han de ampliarse para conocer de forma mas concluyente la influencia de este factor sobre el EPA.

ODENHOLT y col. (1989) al utilizar inóculos elevados no detectan EB ni EPA en reposo, aunque sí al agitar y oxigenar el medio.

Medio de cultivo.

La utilización de diversos medios de cultivo para la determinación de la actividad de un antimicrobiano, es conocido desde antiguo que influye sobre los resultados de ésta.

El caso más típico, en el que se detecta una gran importancia del tipo de medio para la realización de estos estudios, ocurre con Trimetroprim, el cual, utilizado en caldo de soja tripticasa (TSB) y caldo Muller-Hinton, ofrece unos resultados muy dispares. Este distinto comportamiento se debe a la diferencia tan grande de estos medios en cuanto a la proporción de timidina, mayor en (TSB), la cual inhibe la actividad del antimicrobiano en cuestión, hecho que se comprueba al eliminar la timidina del medio y comparar los resultados con aquellos obtenidos en Muller-Hinton (2.4 y 2.2 horas respectivamente) (CRAIG y GUDMUNSON 1986).

WILSON y ROLINSON (1979) no han observado diferencias en el EPA de penicilina sobre Staphylococcus aureus. BUNDTZEN y col (1981) estudiaron la influencia del suero sobre el EPA de

rifampicina y tetraciclina en Escherichia coli y detectaron un gran descenso del EPA, sin embargo, si tenemos en cuenta que el valor de la CMI en el suero aumenta notablemente y adecuamos las condiciones de estudio a multiplos de CMI en el medio donde se va a realizar el ensayo, el EPA en caldo y suero es similar.

CHIN y NEU (1987) observaron con ciprofloxacino un importante efecto de los iones Mg++ sobre el EPA, pero también incidía de forma significativa en la CMI.

Asociación de antimicrobianos.

FUUSTERD (1987c) describió sinergismo, tanto al estudiar la CMI como el EPA, de ampicilina asociada a estreptomocina frente a Enterococcus faecalis y Enterococcus faecium. Destacó una buena correlación entre el incremento del poder bactericida y el EPA al combinar estos dos fármacos.

Amoxicilina más clavulánico ha sido estudiada recientemente por MINGUEZ y col. (1988), observandose en esta asociación un incremento en la actividad bactericida unido al desarrollo de un más prolongado EPA.

Asociación de microorganismos.

MINGUEZ y col. (1989b) han estudiado el EPA de amoxicilina y netilmicina sobre cultivos puros y asociados de E. coli y S. aureus, describiendo sólo un pequeño incremento del EPA

de amoxicilina frente a S. aureus cuando se encontraba en cultivo mixto junto al otro microorganismo.

2.3.2.- MECANISMO DEL EFECTO POSTANTIBIOTICO.

El mecanismo preciso por el que los antimicrobianos inducen la supresión en el crecimiento en la fase postantibiótica es desconocido. Los diferentes EPA's que se producen con las diversas parejas microorganismo-antimicrobiano sugieren que multiples mecanismos estan envueltos en dicho efecto.

La teoría que parece más aceptada es aquella que explica el efecto debido a un daño no letal que se produce en la bacteria y/o a la persistencia de fármaco en los lugares de unión con el microorganismo. El que el EPA llegue a un máximo, tanto en el caso de forzar la concentración como el tiempo de exposición, sugeriría un interacción fármaco-receptor (CRAIG y GUDMUNSON 1986). Es bien conocido que eritromicina, tetraciclina y cloramfenicol se unen reversiblemente a las subunidades ribosómicas específicas de las bacterias susceptibles (WEISBLUM y DAVIES 1968), de esta forma, el EPA de estos antibióticos podría representar el tiempo necesario para difundir desde los ribosomas (CRAIG y GUDMUNSON 1986). Sin embargo, en contraposición con esta hipótesis, GERBER y CRAIG (1981) describieron que el EPA de eritromocina con Streptococcus pneumoniae, no desaparece tras una incubación de 24 horas a 4°C, tiempo durante la cual el

antimicrobiano difunde desde los ribosomas incluso fuera de la célula.

Los aminoglucósidos tienen un efecto letal e irreversible sobre los ribosomas, este hecho, según CRAIG y GUDMUNSON (1986), explicaría la dificultad de la determinación del efecto postantibiótico "in vitro" de estos antimicrobianos. El prolongado EPA "in vivo" de estos fármacos podría representar la unión de cantidades no letales de fármaco con la consecuente paralización de la síntesis proteica. Asi, se podría concluir que durante la exposición a los antimicrobianos inhibidores de la síntesis proteica o ribonucleica, los microorganismos sufren una merma de sus proteínas necesarias para el metabolismo y crecimiento bacteriano; el EPA representaría el tiempo de resíntesis de estas proteínas (CRAIG Y GUDMUNSON 1986). Las quinolonas ejercerían EPA por unirse a la ADN girasa y/o al ADN, el periodo de recuperacion podría representar el tiempo necesario para que se rompa la unión con su lugar de acción (FUUSTERD 1987a).

En el caso de los antibióticos ß-lactámicos, las diferencias entre los EPA's de bacterias Gram-negativos y Gram-positivas hacen más dificil explicar el mecanismo del EPA (CRAIG y GUDMUNSON 1986). Estos antimicrobianos se unen covalentemente a distintas proteínas fijadoras de penicilina, algunas de las cuales estan envueltas en la síntesis de la pared celular (SPRATT 1978). Una posible explicación del EPA sería justificar el tiempo

requerido para la síntesis de nuevas enzimas, sin embargo, no se explicaría la marcada diferencia entre los EPAs de Gram-positivos y Gram-negativos (CRAIG y GUDMUNSON 1986). Es conocido que el complejo penicilina-enzima se puede romper regenerando la enzima sin pérdida de su capacidad sintetizadora (TOMASZ 1979) y la proporción en que esto sucede no es la misma en todos los microorganismos (FUAD y col 1976). Así, la vida media de la unión ß-lactámico-proteína es menor en bacilos Gram-negativos que en cocos Gram-positivos (TAMURA y col 1976; GEORGOPAPADAKOU y KIU 1980). CRAIG y GUDMUNSON (1986) sugieren que la diferencias de EPA entre Gram-positivos y Gram-negativos serían debidas a las diferentes tasas de liberación de las enzimas del complejo, tras la retirada del antimicrobiano del medio.

ODENHOLT y col. (1989) sugieren que la razón por la que sólo imipenem ejerce EPA sobre bacilos Gram-negativos es su lugar de acción, es decir, al actuar sobre las PBP-2 1a y 2a no se originan formas filamentosas, las cuales serían responsables, por su división más rápida y numerosa, de la ausencia de efecto en otros ß-lactámicos que sí inducen estas formas.

2.3.3.- EFECTOS RELACIONADOS CON EL EPA.

Existen otros fenómenos que se producen, al igual que el EPA, tras la exposición a un antimicrobiano, es decir, en la fase postantibiótica. Estos son el incremento de susceptibilidad

de las bacterias a los leucocitos y el "aumento de resistencia" de los microorganismos a determinados antimicrobianos en la fase postantibiótica.

Incremento de susceptibilidad a los leucocitos.

MC DONALD y col. (1981) y PRUUL y col. (1981; 1988) demostraron que los microorganismos tras la exposición a un antimicrobiano se hacen más susceptibles al ataque de los leucocitos. Staphylococcus aureus y Streptococcus pyogenes presentan una mayor susceptibilidad tras el tratamiento que Escherichia coli. Por otro lado, con los inhibidores de la síntesis proteica cloramfenicol y gentamicina, se obtiene una mayor sensibilización que con los ß-lactámicos ampicilina, amoxicilina y cefoxitina, cuando se estudia Escherichia coli.

GERBER y CRAIG (1981) observaron en un modelo experimental con animales normales, que al inyectar microorganismos de un cultivo fresco (sin tratamiento previo) y microorganismos en fase postantibiótica, estos últimos morían más rápidamente que los primeros. Por el contrario, cuando utilizaron animales neutropénicos, las bacterias no morían. Esto indica que la sensibilización a los leucocitos también ocurre "in vivo".

PRUUL y MC DONALD (1979), al estudiar la relación entre el efecto descrito y la concentración de fármaco en el caso de cloranfenicol, observaron un aumento significativo del uno al

aumentar el otro. Con 60 mcg/ml, concentración máxima de cloranfenicol utilizada, no llegaron a la saturación del efecto. También describieron una relación lineal entre tiempo de exposicion y sensibilización de las bacterias, siendo de destacar que tras un minuto de exposición de Escherichia coli a cloranfenicol, detectaron un incremento significativo de la susceptibilidad al ataque leucocitario.

El mecanismo íntimo por el que se produce este efecto no esta totalmente aclarado, MC DONALD y col. (1981) sugieren la posibilidad de que sea debido a las alteraciones a nivel de pared o membrana celular que se producen tras el tratamiento antibiótico. La pared celular y la membrana (estructuras externas bacterianas), son el lugar de acción directa de varios antimicrobianos, sin embargo, existen otros fármacos que aunque no tengan en estas estructuras su lugar de acción, indirectamente las pueden afectar. Así, cloranfenicol, que actúa sobre la peptidiltransferasa a nivel ribosómico, induciría la síntesis de proteínas defectuosas que al incorporarse en la membrana celular alterarían su intergridad y funcionalidad (HIRASHIMA y col 1973; ZUSMAN 1973). También se han descrito cambios en la pared celular de los microorganismos tratados con aminoglucósidos (LIDA y KOIKE 1974). De esta forma, MC DONALD y col. (1981) justifican que los antimicrobianos no ß-lactámicos produzcan alteraciones en las estructuras externas y consiguientemente sensibilicen a las bacterias de igual forma que los ß-lactámicos.

Descenso de la actividad bactericida en la fase postantibiotica.

Los datos que existen sobre este fenómeno son limitados. GERBER y CRAIG (1981) y VOLGEMAN y col. (1983) describieron un descenso de la actividad bactericida de determinados antimicrobianos en la fase postantibiótica. Estos últimos estudiaron Streptococcus pneumoniae y ampicilina cuando la fase postantibiótica había sido inducida por eritromicina. También se ha descrito para ß-lactámicos y Trimetroprim sobre Staphylococcus aureus, Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae previamente tratados con rifampicina o eritromicina.

Este fenómeno, al igual que el EPA, está muy influenciado por el microorganismo (bacilos Gram-negativos se hacen más resistentes que Staphylococcus aureus) y el antimicrobiano (Trimetroprim y ß-lactámicos más que aminoglucósidos) (CRAIG y GUDMUNSON 1986).

2.3.4.- DETERMINACION " in vitro " DEL EFECTO POSTANTIBIOTICO.

Técnicas para la eliminación del antimicrobiano.

En este apartado revisaremos los distintos métodos existentes para la determinación del EPA, señalando sus ventajas e inconvenientes.

Métodos rápidos.

Los métodos rápidos de eliminación del antimicrobiano más utilizados son los lavados repetidos del cultivo y la inactivación por ß-lactamasas. Otros métodos más recientemente empleados son la dilución de cultivo y la filtración con un filtro membrana.

a) Método de lavado . Se basa en la centrifugación el caldo de cultivo a 1200-2000 g durante 5-10 minutos, eliminación del sobrenadante y resuspensión del sedimento en caldo de cultivo sin antimicrobiano (MC DONALD y col 1977; BUNDTZEN y col 1981; KITZIS y col 1984). Todos los investigadores que han utilizado esta técnica, repiten al menos dos veces el proceso previamente indicado. Con la retirada del 90% del sobrenadante en los dos lavados, se consigue una reducción de la concentración de antimicrobiano de aproximadamente 100 veces (MC DONALD y col 1976; 1977). Pero con un más completo decantado del sobrenadante se pueden conseguir reducciones de hasta más de 10000 veces según MC DONALD y col. (1982).

El lavado "per se" puede causar una reducción temporal del crecimiento del microorganismo (PARKER y MARSH 1946), debido posiblemente a un descenso de la temperatura durante la centrifugación, al efecto mecánico de la propia centrifugación e incluso a un peor acceso de los nutrientes

al núcleo de la masa bacteriana. Por ello, es imprescindible utilizar un control sin antibiótico, el cual se someterá al mismo procesamiento que los cultivos expuestos al fármaco.

Este método es aplicable a todos los antibióticos, pero hay que tener en cuenta que el proceso de eliminación se prolonga alrededor de 30 minutos.

b) Inactivación del antimicrobiano. Este método es muy simple y rápido pero es exclusivo de los antibióticos ß-lactámicos (EAGLE 1949; WILSON y ROLINSON 1979). La simple adición de ß-lactamasa, disponible comercialmente, al cultivo expuesto al antimicrobiano, inactiva rápidamente a penicilinas y cefalosporinas. Otro método similar, factible para aminoglucósidos, es la adición de polvo de celulosa, el cual se une e inactiva estos antimicrobianos, pero necesitaría de una posterior centrifugación para separar el complejo polvo-fármaco del medio de cultivo (GERBER y col 1982).

c) Dilución del cultivo. GERBER y CRAIG (1981), BUNDTZEN y col. (1981) utilizaron este método para eliminación del antimicrobiano. Consiste en adicionar un pequeño volumen del cultivo expuesto al antimicrobiano a un volumen mucho mayor de caldo libre de fármaco. La dilución del cultivo primario ha de ser tal, que la cantidad residual de antibiótico que quede no afecte el crecimiento del microorganismo. Para comprobar que esta cantidad no afecta

el normal crecimiento de los microorganismos, se adiciona a un cultivo que servirá como control. A concentraciones cercanas a la CMI, una dilución de 1:100 es suficiente para asegurar una efectiva reducción de la concentración de antimicrobiano; a concentraciones más elevadas de antibiótico serían necesarias diluciones de 1:1000 ó 1:10000, según estudios realizados por BUNDTZEN y col. (1981). Por otra parte, hace falta partir de un elevado inóculo de al menos 10^5-10^6 ufc/ml ya que a la vez que diluímos el antimicrobiano, también se diluye la suspensión bacteriana. Este método, al igual que el de los lavados y centrifugación, puede aplicarse a todos los antimicrobianos, sin embargo, para antibióticos con rápida actividad bactericida, puede darse un reducción en el número de bacterias viables tal, que tras la dilución estos niveles estén por debajo de los detectables en el recuento.

d) Filtración. Este método fué descrito por LORIAN (1986). Consiste en exponer a los microorganismos, situados sobre un filtro membrana, a la acción del fármaco, el cual, a partir del agar sobre el que se dispone el filtro, difunde hacia este. Tras esta exposición el antimicrobiano se elimina por difusión al transferir el filtro a un agar sin antimicrobiano durante unos 10 minutos. Se repite este proceso para asegurar la máxima eliminación de fármaco. Una vez expuesto al antimicrobiano y eliminado éste, se situa el filtro sobre una placa de agar nutritivo precalentado (35°C)

y se incuba. Este técnica, como cabe suponer, utiliza varios filtros membrana sometidos a iguales condiciones, cada filtro se utilizará para el posterior recuento de bacterias viables. Para esto, se suspenden las bacterias adheridas al filtro, por medio de agitación, en solución salina y de esta suspensión se hacen los recuentos en placa (CRAIG y GUDMUNSON 1986).

Una de las ventajas de este método es que el microorganismo es menos afectado por cambios osmóticos y otros efectos mecánicos que se producen en un caldo de cultivo (LORIAN 1986).

Métodos especiales. Modelos farmacocinéticos.

Estos métodos persiguen simular las condiciones "in vivo" de eliminación gradual del antimicrobiano conforme una cinética de orden 1. La exposición de los microorganismos a concentraciones constantes de antimicrobiano, como se hace con las técnicas anteriormente descritas, difiere considerablemente de lo que ocurre "in vivo", esta es la razón por la que se han desarrollado otros métodos más complejos de eliminación del fármaco, simulando las condiciones fisiológicas. Los métodos más utilizados son:

a) Modelo de dilución. Consiste en la eliminación del antimicrobiano por diluciones progresivas del caldo de cultivo que contiene el microorganismo y el fármaco,

sustrayendo de este volumenes iguales a los que se reponen con caldo libre de fármaco. El inconveniente de este modelo es que a la vez que diluímos el antimicrobiano, diluímos el inóculo bacteriano. Algunos autores corrigen el recuento bacteriano de acuerdo con la dilución que se hace del medio (MURAKAWA y col 1980; GERBER y col 1982). SHAH (1981) utiliza un filtro millipore a la salida del frasco para evitar la perdida de microorganismos.

b) Modelo de diálisis. Este modelo se basa en la existencia de dos compartimentos, uno de los cuales contiene el cultivo del microorganismo en estudio y el otro sólo medio de cultivo. Según pretendamos ver el efecto del fármaco, simulando una administración I.V. o I.M., se adiciona éste en el compartimento que contiene los microorganismos o en el otro, respectivamente. Por difusión, a favor de gradiente, pasará de un compartimento al otro, eliminandose así el fármaco. Este método tiene la ventaja, frente al anterior, de no diluir el inoculo bacteriano, sin embargo, ambos modelos farmacocinéticos tienen el inconveniente de no poder delimitar el efecto debido a las concentraciones sub-inhibitorias que van quedando en el medio, del efecto postantibiótico (CRAIG y GUDMUNSON 1986).

2.3.5.- DETERMINACION DEL EPA "in vivo".

Los conocimientos del EPA "in vivo" son mucho más limitados que los existentes sobre dicho efecto "in vitro". Se basan en muestreos seriados de un tejido o fluido biológico de un animal y la determinación de bacterias viables, tras el tratamiento antimicrobiano y descenso de los niveles de fármaco en dichos lugares.

Varios modelos han sido puestos a punto para el estudio del EPA "in vivo":

- infección en muslo de ratón (CRAIG y GUDMUNSON 1986).
- meningitis en conejo (TAUBER y col 1984).
- endocarditis en ratas (HESSEN y col 1989).
- implantación subcutanea de gasa-antibiótico en conejo (RENNEBERG y WALDER 1989).
- implantación subcutanea de "tissues cages" en conejo (ODENHOLT y col 1988).

CUANTIFICACION DEL EPA "in vivo".

El cálculo del EPA "in vivo" es similar al determinado "in vitro", la diferencia radica en un tercer parámetro M (CRAIG y GUDMUNSON 1986):

$$EPA = T - C - M$$

EPA: efecto postantibiótico "in vivo"

T: tiempo requerido para que el número de microorganismos existentes tras la caida del fármaco por debajo de la CMI incrementen su población 1 log 10.

C: tiempo necesario para aumentar 1 log 10 la población no tratada.

M: tiempo durante el cual los niveles de fármaco en el lugar de acción son mayores a la CMI.

CAPITULO TERCERO. APORTACION PERSONAL.

3.1.- OBJETIVOS.

Los objetivos propuestos al inicio del presente trabajo fueron:

1.- Determinación de la sensibilidad (CMI) de distintas cepas de Shigella sonnei, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae y Pseudomonas aeruginosa, aisladas de material clínico, a los inhibidores de la girasa: ácido nalidixico, norfloxacino y ciprofloxacino.

2.- Puesta a punto y adaptación de la técnica de estudio del efecto postantibiótico al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de Granada.

3.- Determinación de la cinética de letalidad (efecto bactericida en el tiempo) de las tres quinolonas, frente a las cepas selecionadas.

4.-Determinación del efecto postantibiótico de ácido nalidixico, norfloxacino y ciprofloxacino sobre las cepas seleccionadas, estudiando la influencia de los factores concentración y tiempo de exposición.

5.-Determinación del efecto postantibiótico de las citadas quinolonas en orina.

3.2.- MATERIAL Y METODOS.

3.2.1.- MICROORGANISMOS ESTUDIADOS.

En este trabajo hemos partido inicialmente de 10 cepas de Shigella sonnei, aisladas de heces de individuos con cuadro diarreico agudo; 10 cepas de Escherichia coli, 10 cepas de Klebsiella pneumoniae y 10 cepas de Pseudomonas aeruginosa aisladas de orinas de individuos con infección del tracto urinario, en el Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Universitario de Granada.

Todos los microorganismos habían sido conservados mediante liofilización. Al inicio de este trabajo se volvió a efectuar la identificación bioquímico-morfológica y tipación serológica en su caso (S. sonnei). Para ello, en primer lugar se procedió a la rehidratación de las cepas liofilizadas, para lo cual se adicionaron unas cuantas gotas de solución salina estéril a los viales. A partir de esta suspensión, se sembró en placas de agar Muller-Hinton y agar Mac Conkey, incubándose en atmósfera aerobia a 35±1°C durante 16-20 horas; de forma paralela se sembraron en caldo Shaedler, incubandose en iguales condiciones (este último medio facilitó el crecimiento de las cepas que no lo hicieron en los medios sólidos). A partir del caldo Shaedler se reaislaron en los medios sólidos ya indicados para, de este modo, proceder a su identificación propiamente. Esta se realizó siguiendo las pautas habituales en el Servicio de Microbiología y Parasitología del H. U. G. y de acuerdo con las

normas establecidas en el "Bergey's Manual of Systematic Microbiology" (BRENNER 1984; PALLERONI 1984).

Los números de referencia de estos microorganismos, en relación a la colección del citado Servicio, se recogen en la tabla 6.

TABLA 6.- NUMEROS DE REFENCIA DE LAS CEPAS UTILIZADAS.

S. sonnei	E. coli	K. pneumoniae	P. aeruginosa
HC- 12	HC- 5	HC-257	HC- 40
HC- 13	HC- 6	HC-280	HC- 46
HC- 20	HC- 9	HC-295	HC- 58
HC- 26	HC- 11	HC-315	HC- 60
HC- 28	HC- 14	HC-320	HC- 83
HC-126	HC- 25	HC-322	HC- 90
HC-127	HC- 32	HC-348	HC- 91
HC-230	HC- 70	HC-712	HC-123
HC-231	HC- 79	HC-776	HC-129
HC-232	HC- 93	HC-791	HC-240

3.2.2.- ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS.

Se empleó sustancia valorada de los siguientes agentes inhibidores de la girasa:

- Acido nalidíxico anhidro (Laboratorios SIGMA; Lote 53F- 5034) en forma de sal sódica con máximo grado de pureza (100%).

- Norfloxacino (Laboratorios MERCK; Lote 0738760) de pureza 996 mcg/g.

- Ciprofloxacino (Laboratorios Bayer; Lote 9867) de pureza 827 mcg/g.

3.2.3.- MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS.

En este apartado pasamos a describir la procedencia, composición y preparación de los medios de cultivo empleados en este trabajo.

CALDO SHAEDLER (Laboratorios OXOID; Code CM 497).

Fórmula (por litro):

Triptona (OXOID; CM 129)	10.0 g
Peptona (OXOID; L 92)	5.0 g
Extracto de levadura (OXOID; L 21)	5.0 g
Dextrosa	5.0 g
Clorhidrato de citeina	0.4 g
Hemina	0.01 g
Tampon TRIS	0.75 g

Para su preparación se disolvieron 26.5 gramos de medio deshidratado en un litro de agua destilada, mezclandose bien hasta obtener una solución homogénea ayudados de calor (hasta ebullición) y agitación manual. Se ajustó el pH a 7.2±0.1 y se repartió en frascos de vidrio (500 ml) para su posterior esterilización en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

AGAR MÙLLER-HINTON (Laboratorios OXOID; Code CM 337).

Fórmula (por litro):

Caldo de carne deshidratado.....300.0 g

Hidrolizado de caseina.....17.5 g

Sterck.....1.5 g

Agar.....17.0 g

Este medio se preparó suspendiendo 38 gramos en un litro de agua destilada, para su disolución se calentó hasta ebullición y agitó manualmente. Una vez disuelto y ajustado el pH a 7.2±0.1 se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos en botellas de vidrio de 500 ml cuando su finalidad fué la preparación de placas de recuento, y en tubos de vidrio de tapón de rosca de 20 ml para la preparación de placas para determinación de CMI.

ORINA.

La orina fué recogida de individuos sanos, con edades

comprendidas entre 25-30 años, en recipientes estériles. Con dichas orinas se hizo un "pool", procediendo posteriormente a su esterilización en autoclave (121°C durante 15 minutos).

Antes de cada experiencia se comprobó el pH, y sobre un pequeño volumen de orina se determinó la concentración de magnesio.

DETERMINACION DE MAGNESIO EN ORINA.

Para la cuantificación de Mg++ se siguió una técnica colorimétrica (Biotrol R) que utiliza azul de calmagite para formar un complejo coloreado con magnesio, de intensidad proporcional a la concentración de éste. Para eliminar la interferencia de calcio y otros metales utiliza EGTA y cianuro potásico. La lectura espectrofotométrica se realiza a 540 nm (GINDER y HETH 1971).

3.2.4.- DESCRIPCION DEL ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD. TECNICA DE CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA.

Como fase previa en el estudio del efecto bactericida en el tiempo y efecto postantibiótico se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI's) de las tres quinolonas en estudio frente a las cepas de Shigella sonnei, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae y Pseudomonas aeruginosa. Para dicha determinación hemos utilizado la técnica de las diluciones dobles progresivas en medio sólido, que pasamos a describir a continuación.

PREPARACION DEL INOCULO. A partir de un cultivo de 16-20 horas en agar Mac Conkey de cada microorganismo estudiado se toma con un asa una colonia y se inocula en 8-10 ml de caldo Shaedler. Se incuba a 35+1 °C hasta que se alcanza la fase logarítmica de crecimiento, lo que se logra tras 4-6 horas en agitación.

PREPARACION DEL ANTIMICROBIANO. Se procede a la preparación de una solución patrón de cada uno de los antimicrobianos ensayados, para lo cual se diluyen 25.6 mg de la sustancia valorada del fármaco en 10 ml de agua destilada estéril. En el caso de norfloxacino se solubilizó en dimetil-sulfoxido (DMSO). Para los antimicrobianos que no estaban en máximo grado de pureza, se adaptó ésta, para que la cantidad de sustancia activa pesada fuese 25.6 mg.

Una vez preparada la solución patrón se procedió a la realización de las diluciones seriadas de cada antimicrobiano, dieciseis diluciones en total para cada uno, lo que supone un rango desde 2560 a 0.06 mcg/ml.

PREPARACION DE LA PLACAS. Se han utilizado placas de Petri estériles de 145 mm de diámetro en las que, normalmente probamos 8 cepas diferentes por placa. Para ello dividimos las placas en 8 partes, señalando en el fondo, con rotulador la cepa de prueba. El medio utilizado fué el agar Muller-Hinton preparado en tubos de 20 ml como se detalló anteriormente. Estos para su utilización se funden al baño maría.

Para la prueba, y por cada antimicrobiano, se utilizan series de placas numeradas del 1 al 16, siendo la primera la que contendrá la máxima concentración de fármaco. Con una pipeta de dispensación automática se toman 1000 mcl del tubo que contiene la solución patrón y se depositan en la primera placa. Para el resto de la placas se toman 1000 mcl del tubo que contiene la dilución apropiada del fármaco y se depositan en la placa correspondiente a esa dilución. A continuación, se añade a cada placa 20 ml de agar Muller-Hinton previamente fundido y mantenido a una temperatura de 45°C, aproximadamente, en baño maría, y se mezclan bien para que el antimicrobiano se reparta uniformemente por el medio. De esta manera, en cada serie de placas se obtienen las siguientes concentraciones finales de antimicrobiano: 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.1, 0.25, 0.125, 0.06, 0.03, 0.015, 0.007 y 0.003 mcg/ml.

Una vez secas las placas, se procede a la siembra multiple en superficie de cada una de las cepas que se van a estudiar. Para ello, se ha utilizado un asa calibrada que proporciona 0.001ml de cultivo de la suspension bacteriana con densidad de crecimiento de 10^{5} a 10^{6} unidades formadoras de colonias por mililitro. La siembra se hace a partir de caldo Shaedler.

Efectuada la siembra, las placas se incuban en una estufa a 35±1°C durante 18-24 horas.

CONTROL. Como control de crecimeinto se inoculan las distintas cepas ensayadas en el medio referido pero sin antimicrobiano, incubándose en las mismas condiciones que las placas que contienen el fármaco. Asi mismo, en cada serie se incluyó la cepa de referencia Escherichia coli ATCC 25922.

LECTURA. Tras 18-24 horas de incubación se procede a la lectura de la placas, definiendose la concentración mínima inhibitoria (CMI) como la mínima concentración de fármaco que impide un desarrollo bacteriano objetivable a simple vista, o el 80% del crecimiento en relación al control.

De acuerdo con el conocimiento de los valores obtenidos de CMI para las distintas cepas, se elegieron al azar cuatro cepas de cada especie para realizar el estudio de efecto bactericida en el tiempo y efecto postantibiótico, es decir, la elección al azar sólo se hizo con cepas de las que se conocía

exactamente su CMI, eliminando aquellas con valores de CMI no detectados por ser menores de 0.007 mcg/ml (hecho que ocurrió con ciprofloxacino) así como las resistentes.

3.2.5.- DESCRIPCION DEL ESTUDIO DEL EFECTO BACTERICIDA EN EL TIEMPO.

PREPARACION DEL INOCULO. El microorganismo debía estar en fase logarítmica de crecimiento en el momento de exponerlo al antimicrobiano. Esto se consiguió mediente la inoculación de una o dos colonias del mismo, previamente sembrado 16-20 horas antes en medio sólido (agar Muller-Hinton) e incubado 35±1 °C, en un caldo de cultivo Shaedler, del que se hacían diluciones seriadas 1:10 e incubaron durante la noche (8-10 horas). Al día siguiente se elegía el tubo con una densidad óptica de 0.3 medida a 580 nm en un espectrofotómetro. Este método nos permitía empezar las experiencias a primera hora de la mañana. Otra forma de conseguir un inóculo con crecimiento en fase exponencial fué diluir un cultivo de 16-20 horas en un medio líquido precalentado 1000 veces, dicho medio se incubó en agitación hasta alcanzar la densidad óptica antes indicada. Este método se siguió cuando la experiencia comenzaba a media mañana, ya que se alcanzaban las condiciones óptimas tras 3-4 horas de incubación.

Se utilizaron dos tipos de inóculo, uno de 10^5-10^6 ufc/ml que fué suficiente para el estudio del efecto bactericida

y postantibiótico de ácido nalidíxico, ya que su actividad es menor y su cinética más lenta, y otro de 10^6-10^7 ufc/ml para los otros dos inhibidores de la girasa. La razón de este inóculo mayor fue el no perder toda la masa microbiana, tras la exposición, para el estudio del efecto postantibiótico.

Para obtener inóculos finales de 105-106 y 106-107 ufc/ml se tomó 0.1 ml y 1 ml, respectivamente, de la suspensión madre y se adicionaron a 99.9 ml de caldo Shaedler el primero y a 99.0 ml el segundo.

PREPARACION DEL ANTIMICROBIANO. Se preparó una solución madre de antimicrobiano en agua destilada estéril para a. nalidíxico y ciprofloxacino, y en DMSO para norfloxacino. La solución se preparó 100 veces más concentrada que la máxima concentración final que se pretendió ensayar (8 veces la CMI para estudios en caldo Shaedler y 300 mcg/ml para ensayos en orina). A partir de la solución de 8 veces la CMI se hacen diluciones dobles seriadas, de forma que tomando 1 ml de estas diluciones y adicionandolo a 99 ml de caldo con la bacteria en estudio, se obtienen concentraciones finales de 8, 4 ,2 y 1 vez la CMI. Para obtener una concentración final de 300 mcg/ml (concentración urinaria) se diluye de forma análoga la solución patrón de 30 mg/ml.

INCUBACION. La incubación para el estudio del EB se hizo en una estufa con agitador AUTOBAC-1 que proporcionaba una agitación de 110 rpm a temperatura 35 ± 1°C.

RECUENTO DE BACTERIAS VIABLES EN PLACA. Para el establecimiento de la curva de letalidad se hicieron recuentos de bacterias viables en el momento de la exposición (tiempo 0), a los 30 y 60 minutos y cada hora, hasta un total de ocho a partir de la exposición.

Para ello se tomó 0.1 ó 0.2 ml de los cultivos y se diluían en solución salina estéril, tantas veces como nos interesara, con el fin de facilitar el recuento de ufc en las placas donde se inoculaban para su posterior recuento. Así pues, se prepararon tubos que contenían 1.8 o 9.9 ml de solución salina estéril, de forma que al adicionarles 0.2 y 0.1 ml de caldo de cultivo, respectivamente, diluíamos al 1:10 y al 1:100.

Con el fin de abarcar un amplio rango de concentraciones bacterianas, para cada recuento se sembraron tres diluciones consecutivas de cada muestra, así nos asegurabamos tener al menos una placa con un número de colonias entre 20-300, margen óptimo para un recuento fiable.

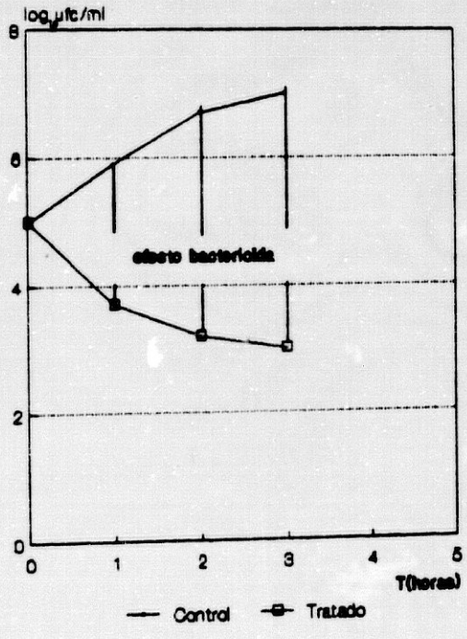
INCUBACION DE PLACAS Y RECUENTO DE COLONIAS. Las placas una vez inoculadas se incubaron 16-20 horas en estufa a 35$\pm$1°C. Tras este tiempo se efectuó el contage de colonias por placa, y teniendo en cuenta el volumen sembrado (0.1 ml) y de la dilución de que procedían, calculábamos el número de ufc/ml.

bacterias viables/ml = N de colonias/placa x 10 x f

donde f es el factor de dilución.

CALCULO DEL EFECTO BACTERICIDA. El cálculo de la actividad bactericida en el tiempo se hizo a partir de la curva de letalidad trazada para cada cepa y concentración de antimicrobiano. Dicha representación gráfica se hace en unos ejes de coordenadas, donde en abcisas se representa el tiempo de exposición y en ordenadas indicamos los valores obtenidos de ufc/ml expresados en forma logarítmica decimal (vease figura 7). El EB se calculó como la diferencia de población entre un cultivo expuesto al antimicrobiano y otro control (no expuesto).

FIGURA 7.- CURVA DE LETALIDAD. EFECTO BACTERICIDA.



3.2.6.- DESCRIPCION DEL ESTUDIO DEL EFECTO POSTANTIBIOTICO.

La técnica seguida tanto para evaluar la influencia de la concentración como la del tiempo de exposición fue la misma, la diferencia radicó en el tiempo de exposición, que fue de 60 minutos para el primer estudio y de 30, 60 y 120 para el segundo. Las concentraciones ensayadas fueron la CMI y 2, 4 y 8 veces ésta. Cuando el estudio se realizó en orina, se utilizó la concentración urinaria de estos fármacos (300 mcg/ml) siendo el periodo de exposición 60 minutos.

PREPARACION DEL INOCULO BACTERIANO Y SOLUCION DEL ANTIMICROBIANO. Se realizaron siguiendo las mismas técnicas detalladas para el efecto bactericida.

Una vez expuesto el microorganismo al fármaco, estos se mantuvieron en contacto durante 30, 60 ó 120 minutos como se indicó anteriormente. Esta exposición se llevó a cabo en el incubador agitador AUTOBAC-1. Al igual que en el estudio del efecto bactericida, disponemos de un control de crecimiento, es decir, del mismo inóculo sin exponer al antimicrobiano.

ELIMINACION DEL ANTIMICROBIMO. Tras el tiempo de exposición ensayado, el antimicrobiano se eliminó del caldo de cultivo con el fin de poder estudiar el efecto postantibiótico. Para ello utilizamos la técnica de dilución en medio libre de fármaco. Se llevó a cabo tomando 0.1 ml ó 1 ml de caldo de cultivo previamente inoculado e incubado, y lo adicionamos a 99.9 ó 99

ml, respectivamente, de medio sin antimicrobiano y precalentado a 35±1°C, obteníamos así diluciones 10-2 y 10-3 respectivamente. La concentración residual de antimicrobiano en el medio era lo suficientemente baja para no interferir en nuestro estudio, hecho que de otra parte se comprobó.

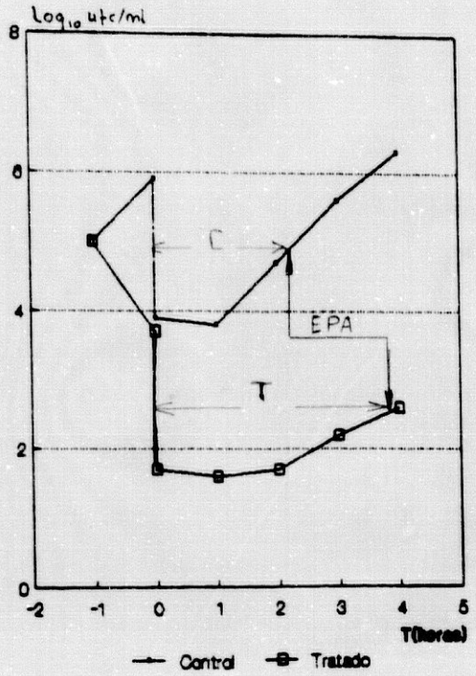
Para el estudio del EPA en orina se utilizó un sistema mixto de eliminación del fármaco. Este consistió en una centrifugación, durante 10 minutos a 2500 rpm, eliminación del sobrenadante y resuspensión del sedimento, seguida de una dilución 1:1000 en dicho medio precalentado.

RECUENTO DE BACTERIAS VIABLES EN PLACA. El recuento se hizo a tiempo 0, tras la exposición al antimicrobiano (30, 60 y 120 minutos) y cada hora hasta un total de ocho a partir del momento de la exposición (doce en orina).

Las diluciones de los cultivos para su siembra en las placas, ésta y el posterior recuento de colonias se hizo como se ha detallado previamente en el apartado referente al efecto bactericida.

CALCULO DEL EFECTO POSTANTIBIOTICO. Después de realizado el recuento de placas y una vez calculadas las ufc/ml en cada momento del estudio, se procedió a la representación gráfica de los valores de ufc/ml en ordenadas, en forma de logaritmos decimales, frente al tiempo (eje de abcisas), obteniendo se una gráfica similar a la representada en la figura 8.

FIGURA 8.- EFECTO POSTANTIBIOTICO.



El efecto postantibiótico se calculó según la fórmula:

$$EPA = T - C$$

dónde EPA es efecto postantibiótico; T tiempo requerido por los microorganismos expuestos al antimicrobiano para incrementar su población un log 10 de ufc/ml frente a la que existía en el medio justo tras la eliminación del fármaco; C es el tiempo requerido por el control (no expuesto) para aumentar su población un log 10 respecto a la observada tras la dilución.

3.2.7.- TRATAMIENTO ESTADISTICO.

Los datos experimentales se expresan como la media de los valores obtenidos de las distintas cepas y/o tratamientos $\pm$ la desviación estándar de la media.

Para comparar valores de dos tratamientos se verificó, en primer lugar, si las varianzas muestrales de ambos grupos se podían considerar iguales o diferentes a un nivel de significación de 0.05, mediante el test de significación de diferencias entre dos varianzas de Snedecor (1956). Según el caso, se aplicó el test correspondiente de la "t" de Student (1907) calculándose, mediante un programa de ordenador, el valor de la probabilidad de que ambas muestras pertenezcan a la misma población.

3.3.- RESULTADOS.

3.3.1.- ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD DE LOS MICROORGANISMOS A LAS TRES QUINOLONAS.

En las tablas 7-10 se reflejan las concentraciones mínimas inhibitorias de a. nalidixico, norfloxacino y ciprofloxacino frente a las distintas cepas de Shigella sonnei, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli y Pseudomonas aeruginosa.

Destacamos la elevada actividad de ciprofloxacino, el cual es capaz de inhibir cepas de S. sonnei a concentraciones inferiores a 0.003 mcg/ml.

Acido nalidíxico fué el menos activo para todas las cepas ensayadas, mostrandose inactivo (CMI mayor o igual 128 mcg/ml) frente a todas las cepas de P. aeruginosa.

Una vez conocidas las concentraciones mínimas inhibitorias de las tres quinolonas frente a las 40 cepas iniciales, seleccionamos cuatro de cada especie para el estudio de la actividad bactericida en el tiempo y efecto postantibiótico. Dicha selección se hizo al azar entre las cepas con CMI's conocidas y sensibles a los fármacos en estudio, siendo estas:

- S. sonnei: HC-13, 126, 231 y 232.
- K. pneumoniae: HC-712, 776, 791 y 257.
- E. coli: HC-5, 9, 11 y 14.
- P. aeruginosa: HC-40, 46, 58 y 60.

TABLA 7.- CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS DE ACIDO NALIDIXICO, NORFLOXACINO Y CIPROFLOXACINO FRENTE A CEPAS DE Shigella sonnei.

Cepa	Nalidíxico	Norfloxacino	Ciprofloxacino
HC- 12	2	0.06	0.015
HC- 13	2	0.03	0.007
HC- 20	2	0.06	0.007
HC- 26	2	0.06	0.015
HC- 28	2	0.06	0.007
HC-126	2	0.06	0.007
HC-127	2	0.03	≤0.003
HC-230	2	0.06	≤0.003
HC-231	2	0.06	0.007
HC-232	8	0.03	0.007
rango	2-8	0.03-0.06	≤0.003-0.015

Lo resultados se expresan en mcg/ml.

TABLA 8.- CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS DE ACIDO NALIDIXICO, NORFLOXACINO Y CIPROFLOXACINO FRENTE A CEPAS DE Klebsiella pneumoniae.

Cepa	Nalidíxico	Norfloxacino	Ciprofloxacino
HC -791	2	0.03	0.03
HC -776	2	0.12	0.03
HC -712	4	0.50	0.06
HC -257	2	0.12	0.25
HC- 280	2	0.06	0.015
HC-295	2	0.12	0.03
HC-315	2	0.25	0.06
HC-320	2	0.12	0.06
HC-322	4	0.50	0.12
HC-348	8	0.50	0.25
rango	2-8	0.03-0.50	0.015-0.25

Los resultados se expresan en mcg/ml.

TABLA 9.- CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS DE ACIDO NALIDIXICO, NORFLOXACINO Y CIPROFLOXACINO FRENTE A CEPAS DE Escherichia coli.

Cepa	Nalidíxico	Norfloxacino	Ciprofloxacino
HC- 5	2	0.125	0.030
HC- 6	2	0.015	0.007
HC- 9	2	0.015	0.007
HC- 11	2	0.030	0.007
HC- 14	2	0.030	0.007
HC- 25	2	0.06	0.007
HC- 32	8	0.12	0.03
HC- 70	2	0.06	≤0.003
HC- 79	2	0.03	0.007
HC- 93	4	0.03	0.015
rango	2-8	0.03-0.12	≤0.003-0.03
ATCC 25922	2	0.06	0.007

Los resultados se expresan en mcg/ml.

TABLA 10.- CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS DE ACIDO NALIDIXICO, NORFLOXACINO Y CIPROFLOXACINO FRENTE A CEPAS DE Pseudomonas aeruginosa.

Cepa	Nalidíxico	Norfloxacino	Ciprofloxacino
HC- 40	>128	1.0	0.25
HC- 46	128	0.5	0.25
HC- 58	>128	0.5	0.12
HC- 60	>128	1.0	0.25
HC- 83	128	0.06	0.007
HC- 90	128	0.06	0.007
HC- 91	128	0.03	0.015
HC-123	>128	1.0	0.12
HC-129	128	0.5	0.12
HC-240	128	0.5	0.06
rango	128->128	0.03-1.0	0.007-0.25

Los resultados se expresan en mcg/ml.

3.3.2.- PUESTA A PUNTO Y ADAPTACION DE LA TECNICA DE ESTUDIO DEL EFECTO POSTANTIBIOTICO.

Para la puesta a punto y estandarización de la técnica de estudio del efecto postantibiótico (EPA) se utilizó la cepa de colección Escherichia coli ATCC 25922 expuesta a cuatro veces la CMI de ciprofloxacino (0,028 mcg/ml) durante una hora. El inóculo inicial fué de aproximadamente 5x106 ufc/ml. La eliminación del fármaco se hizo por dilución 1:100 y 1:1000. Se repitió cuatro veces la experiencia, no encontrandose diferencias significativas entre los efectos obtenidos (tabla 11).

TABLA 11.- EFECTO POSTANTIBIOTICO DE CUATRO VECES LA CMI DE CIPROFLOXACINO SOBRE Escherichia coli ATCC 25922 TRAS ELIMINACION POR DILUCION 1:100 Y 1:1000.

	EPA(horas)				
Dilución	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	m±sd
1:1000	2.2	2.0	2.1	2.0	2.1±0.1
1:100	2.0	2.1	1.9	2.0	2.0±0.1

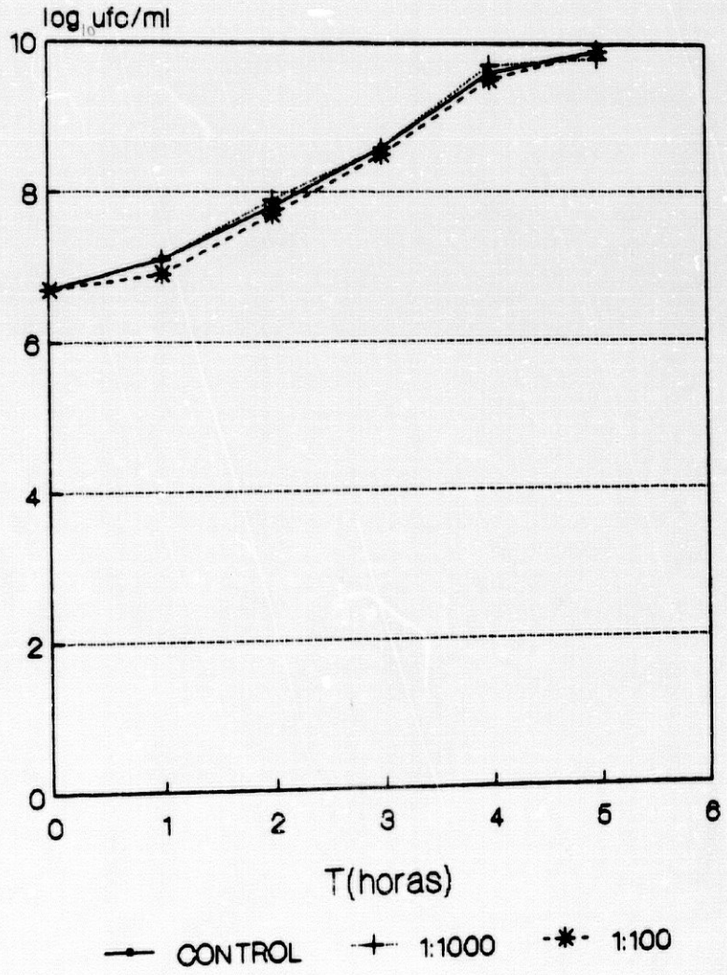
Los resultados obtenidos fueron comparables a los descritos por CRAIG y GUDMUNSON (1986). Por otra parte, se consiguió una notable reproductibilidad en los cuatro ensayos.

Para comprobar que las concentraciones residuales de fármaco tras la dilución no afactaban el crecimiento bacteriano, se expuso a la cepa patrón de E. coli a concentraciones similares a las residuales tras diluciones 1:100 y 1:1000 del cultivo cuando el fármaco era utilizado a concentraciones 8 veces la CMI (0.00056 y 0.000056 mcg/ml respectivamente).

La figura 9 muestra como estas concentraciones no modifican el crecimiento del microorganismo.

De esta forma se estableció que, para concentraciones de fármaco moderadas (entre la CMI y 8 veces ésta), era suficiente una dilución 1:100 para eliminar concentraciones eficaces de fármaco, esta dilución presenta ventajas, frente a la mayor, al no reducir excesivamente el número de microorganismos en el medio de cultivo.

FIGURA 9.-CURVAS DE CRECIMIENTO TRAS ELIMINACION DE CIPROFLOXACINO POR DILUCION.



3.3.3.- ESTUDIO DEL EFECTO BACTERICIDA EN EL TIEMPO.

SHIGELLA SONNEI.

Acido nalidíxico mostró una actividad bactericida lenta pero mantenida en el tiempo, de forma que a las concentraciones ensayadas se observan descensos de población significativos hasta la tercera o cuarta hora de exposición. Por otra parte, la influencia de los incrementos de concentración de fármaco sobre el efecto bactericida (EB) fué menor, existiendo diferencias significativas sólo entre la concentración mayor y menor estudiadas (tabla 12).

En la tabla 13 se refleja el EB de cuatro concentraciones de norfloxacino frente a S. sonnei. De forma similar a ácido nalidíxico, el efecto se hace mayor al aumentar el tiempo de exposición, pero más rápidamente. La influencia de la concentración fué mantenida a lo largo del tiempo, con diferencias notables entre la menor concentración y las demás.

Ciprofloxacino ejerce un EB muy rápido con una elevada reducción del número de bacterias en las dos primeras horas de exposición, no detectandose cambios significativos, a ninguna de las concentraciones ensayadas, a partir de la tercera hora de exposición. Este EB, tan rápido como intenso, fué el responsable de que a concentraciones ocho veces la CMI y a partir de la segunda hora de exposición no se pudieran determinar las

bacterias viables por el sistema utilizado (inferior a 10ufc/ml).

La influencia de la concentración sobre el EB se manifestó de forma más marcada entre las concentraciones CMI y 2 veces ésta, tras exposiciones cortas (0.5 - 2 horas) (tabla 14).

TABLA 12.- EFECTO BACTERICIDA DE AC. NALIDIXICO FRENTE A CEPAS DE Shigella sonnei.

	Tiempo de exposición.					
Conc.	0.5	1	2	3	4	5
CMI	0.4±0.1	1.1±0.1a	2.9±0.1a	4.9±0.5a	6.0±0.3a	6.2±0.2
2xCMI	0.5±0.1	1.3±0.4a	3.7±0.7a	5.2±0.3a	6.0±0.4a	6.3±0.3
4xCMI	0.7±0.3	1.6±0.5a	3.7±0.7a	5.4±0.2a	6.1±0.3a	6.4±0.2
8xCMI	0.9±0.4	2.3±0.4ab	4.1±0.7ab	5.5±0.4a	6.2±0.3	6.3±0.4

Los resultados se expresan en log 10 ufc/ml, como la media aritmética ± la desviación estándar de las cuatro cepas.

a: significación estadística frente a tiempos inferiores ($p<0.05$)

b: " " " " CMI ($p<0.05$).

TABLA 13.- EFECTO BACTERICIDA DE NORFLOXACINO FRENTE A CEPAS DE Shigella sonnei.

	Tiempo de exposición.					
Conc.	0.5	1	2	3	4	5
CMI	0.6±0.1	1.5±0.4a	4.1±0.4a	5.2±0.2a	5.6±0.2	6.1±0.2a
2xCMI	1.7±0.3b	3.3±0.3ab	5.1±0.7a	6.1±0.3b	6.4±0.2b	6.7±0.2b
4xCMI	1.9±0.4b	3.7±0.6ab	5.3±0.5ab	6.2±0.3ab	6.5±0.2b	6.8±0.2b
8xCMI	2.0±0.4b	3.8±0.6ab	5.3±0.6ab	6.2±0.2ab	6.7±0.2ab	6.9±0.1b

Los resultados se expresan en log 10 ufc/ml, como la media aritmética ± la desviación estándar de las cuatro cepas.

a: significación estadística frente a tiempos inferiores ($p<0.05$)

b: " " " " CMI ($p<0.05$).

TABLA 14.- EFECTO BACTERICIDA DE CIPROFLOXACINO FRENTE A CEPAS DE Shigella sonnei.

	Tiempo de exposición.					
Conc.	0.5	1	2	3	4	5
CMI	0.7±0.1	1.4±0.1a	3.5±0.8a	5.1±1.1	5.5±1.0	5.8±0.9
2xCMI	1.3±0.3b	2.6±0.6ab	4.9±0.1ab	6.4±0.3a	6.8±0.3	7.0±0.3
4xCMI	1.6±0.1b	3.3±0.3ab	5.3±0.3ab	6.8±0.3a	7.3±0.4b	7.8±0.6b
8xCMI	2.1±0.3b	4.4±0.4ab	6.1±0.6a	-	-	-

Los resultados se expresan en log 10 ufc/ml, como la media aritmética ± la desviación estándar de las cuatro cepas.

a: significación estadística frente a tiempos inferiores ($p<0.05$)

b: " " " " CMI ($p<0.05$).

KLEBSIELLA PNEUMONIAE.

Las tablas 15-17 reflejan los EB en el tiempo de las cuatro cepas de K. pneumoniae durante su exposición a cuatro veces la CMI de a. nalidixico, norfloxacino y ciprofloxacino respectivamente.

A. nalidíxico muestra una menor y más lenta actividad bactericida al compararlo con los otros dos fármacos. Ciprofloxacino es el más rápido en su acción. Cabe destacar el efecto más gradual de norfloxacino, el cual produce descensos de población significativos durante un periodo de tiempo mayor.

Las curvas de letalidad de concentraciones mínima inhibitoria, 2, 4 y 8 veces ésta, de los tres fármacos sobre K. pneumoniae HC-776 se muestran en las figuras 10-12. Se observa una clara dependencia con la concentración, a la vez que un comportamiento similar de norfloxacino y ciporfloxacino más activos que a. nalidíxico.

TABLA 15.- EFECTO BACTERICIDA DE CUATRO VECES LA CMI DE A. NALIDIXICO FRENTE A CEPAS DE Klebsiella pneumoniae.

	Tiempo de exposición.					
Conc.	0.5	1	2	3	4	5
HC - 776	0.9	1.7	4.2	4.8	4.9	4.9
HC - 712	0.6	1.3	3.0	4.7	5.7	6.8
HC - 257	0.8	1.7	5.1	6.7	6.9	7.0
HC - 791	0.8	1.5	4.2	5.0	6.1	6.5
M ± DE	0.8±0.1	1.5±0.2a	4.1±0.9a	5.3±0.9	5.9±0.7	6.4±0.8

Los resultados se expresan en log 10 ufc/ml, como la media aritmética ± la desviación estándar de las cuatro cepas.

a: significación estadística frente a tiempos inferiores ($p<0.05$)

TABLA 16.- EFECTO BACTERICIDA DE CUATRO VECES LA CMI DE NORFLOXACINO FRENTE A CEPAS DE Klebsiella pneumoniae.

	Tiempo de exposición.					
Conc.	0.5	1	2	3	4	5
HC - 776	2.7	4.0	5.8	6.5	7.1	7.6
HC - 712	2.4	4.8	6.1	7.2	8.5	9.7
HC - 257	2.1	4.1	6.0	7.1	7.8	8.4
HC - 791	2.5	4.3	5.9	6.8	7.7	8.5
M±DE	2.4±0.2	4.3±0.3a	5.9±0.1a	6.9±0.3a	7.8±0.6a	8.5±0.9

Los resultados se expresan en log 10 ufc/ml, como la media aritmética ± la desviación estándar de las cuatro cepas.

a: significación estadística frente a tiempos inferiores ($p<0.05$)

TABLA 17.- EFECTO BACTERICIDA DE CUATRO VECES LA CMI DE CIPROFLOXACINO FRENTE A CEPAS DE Klebsiella pneumoniae.

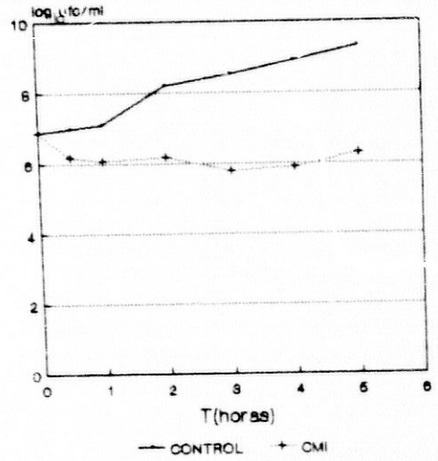
	Tiempo de exposición.					
Conc.	0.5	1	2	3	4	5
HC - 776	1.8	5.0	5.8	6.0	6.1	6.3
HC - 257	2.7	5.5	6.9	8.2	>8	>8
HC - 791	2.5	5.2	6.6	7.4	>8	>8
M±DE	2.4±0.4	5.2±0.2a	6.6±0.6a	7.4±1.0	-	-

Los resultados se expresan en log 10 ufc/ml, como la media aritiméica ± la desviación estándar de las cuatro cepas.

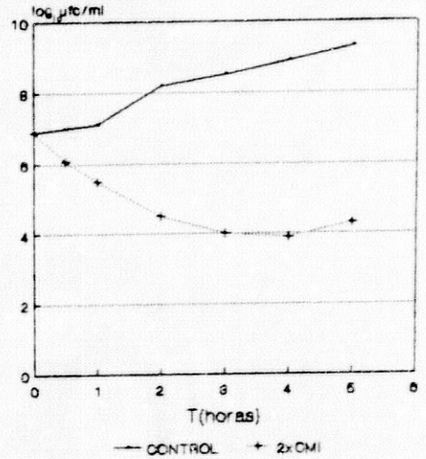
a: significación estadística frente a tiempos inferiores ($p<0.05$)

FIGURA 10.- EFECTO BACTERICIDA DE VARIAS CONCENTRACIONES DE A. NALIDIXICO FRENTE A *K. pneumoniae* HC-776.

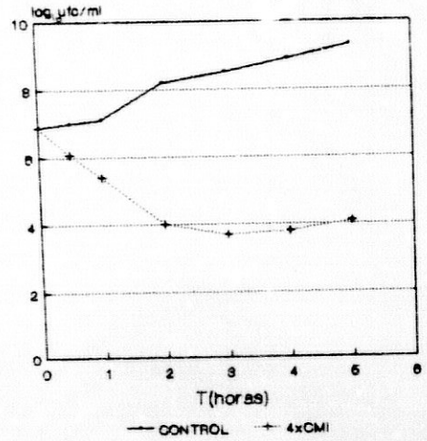
C M I



2 x C M I



4 x C M I



8 x C M I

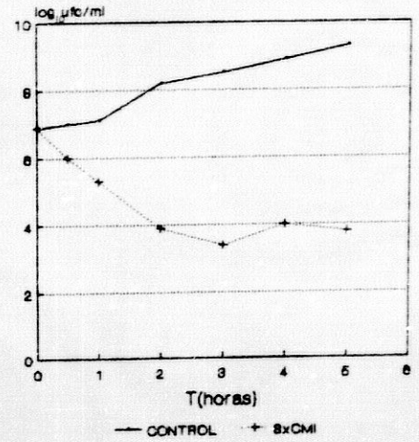


FIGURA 11.- EFECTO BACTERICIDA DE VARIAS CONCENTRACIONES DE NORFLOXACINO FRENTE A *K. pneumoniae* HC-776

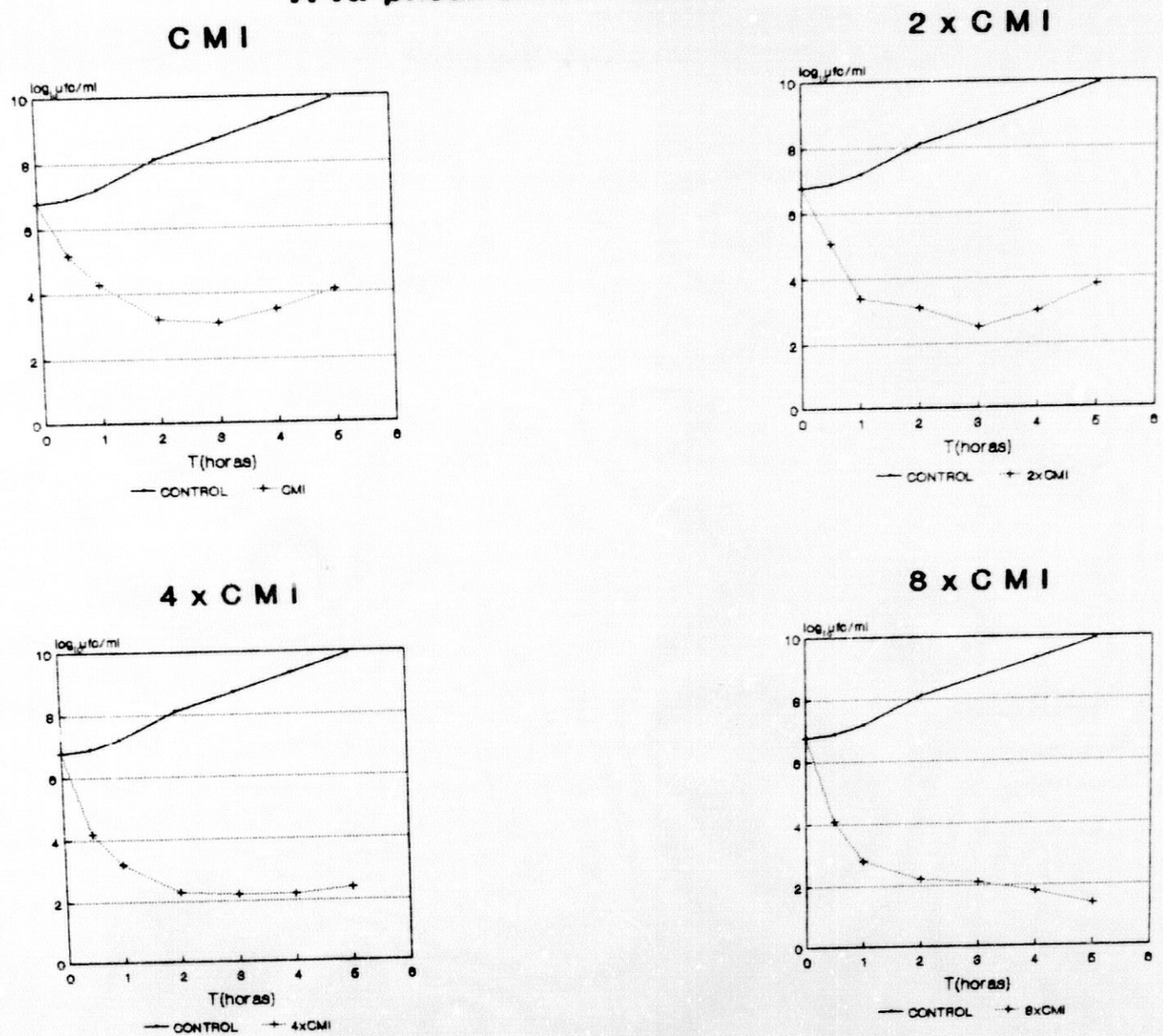
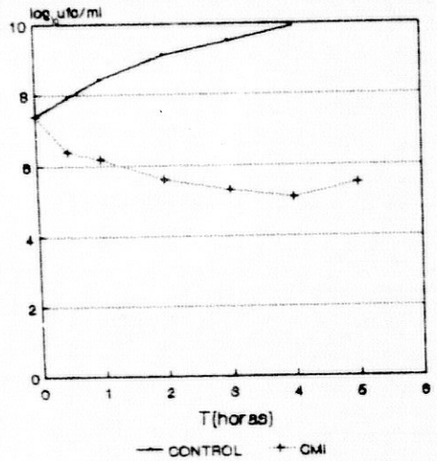
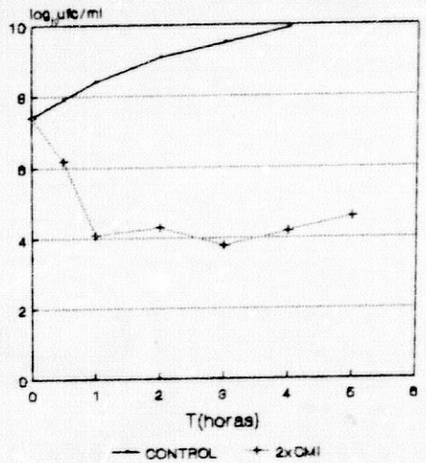


FIGURA 12.- EFECTO BACTERICIDA DE VARIAS CONCENTRACIONES DE CIPROFLOXACINO FRENTE A *K. pneumoniae* HC-776.

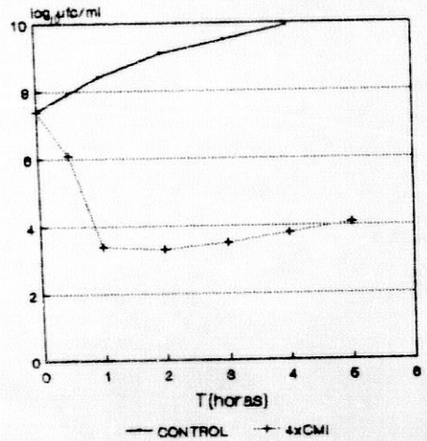
C M I



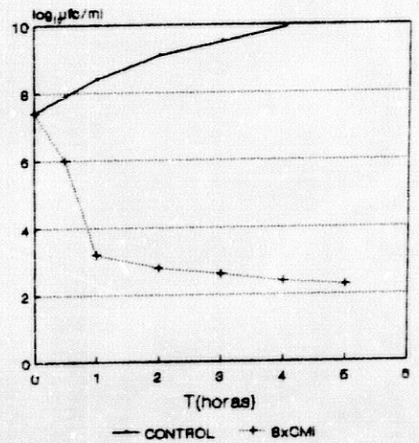
2 x C M I



4 x C M I



8 x C M I



ESCHERICHIA COLI.

Frente a E. coli, el EB en el tiempo de ciprofloxacino se mostró mucho más rápido e intenso que el de a. nalidíxico y norfloxacino, así, tras una hora de exposición este fué de 5.4±0.4 h, para el primero y de sólo 2.4±0.9 h y 1.3±0.4 en el caso de norfloxacino y a. nalidixico respectivamente, siendo las diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$).

Debido a la fuerte actividad bactericida de ciprofloxacino, a partir de la tercera hora de exposición no pudimos conocer la población residual al encontrarse por debajo de 10 ufc/ml.

No se detectaron diferencias significativas a partir de la tercera hora de exposición en el EB de norfloxacino, y de la cuarta hora en el caso de a. nalidíxico, siendo de destacar que éste último alcanzó, aunque más lentamente, un EB superior al del primero (tablas 18-20).

En las figuras 13-15 se reflejan las curvas de letalidad de distintas concentraciones (CMI, 2, 4 y 8 veces ésta) de a. nalidíxico, norfloxacino y ciprofloxacino frente a E. coli HC-5. Se observan grandes diferencias entre las cinéticas seguidas durante la exposición a a. nalidíxico y las quinolonas fluoradas, fundamentalmente a las concentraciones menores.

Norfloxacino y ciprofloxacino se muestran más activas y con una elevada velocidad de acción. Al aumentar la concentración, a pesar de la mayor potencia de ciprofloxacino, las cinéticas se asemejan más llegandose con los tres fármacos, y a partir de dos horas de exposición, a reducciones de 1000 veces la población inicial.

TABLA 18.-EFECTO BACTERICIDA DE CUATRO VECES LA CMI DE AC. NALIDIXICO FRENTE A CEPAS DE Escherichia coli.

	Tiempo de exposición.					
Cepa	0.5	1	2	3	4	5
HC - 5	0.7	2.0	5.4	5.9	6.1	6.3
HC - 9	0.5	1.2	4.7	5.7	6.3	6.9
HC -11	0.6	1.1	5.0	6.1	6.6	7.0
HC -14	0.5	1.0	3.8	6.0	6.8	7.5
M±DE	0.6±0.1	1.3±0.4a	4.7±0.6a	5.9±0.1a	6.4±0.3a	6.9±0.4

Los resultados se expresan en log 10 ufc/ml, como la media aritmética ± la desviación estándar de las cuatro cepas.

a: significación estadística frente a tiempos inferiores ($p<0.05$)

TABLA 19- EFECTO BACTERICIDA DE CUATRO VECES LA CMI DE NORFLOXACINO FRENTE A CEPAS DE Escherichia coli.

	Tiempo de exposición.					
Cepa	0.5	1	2	3	4	5
HC - 5	1.8	3.5	4.8	5.8	6.0	6.1
HC - 9	0.8	1.5	3.2	4.5	5.0	5.3
HC -11	1.4	2.6	4.1	5.3	5.9	6.5
HC -14	1.0	1.9	3.9	5.0	5.2	5.5
M±DE	1.2±0.4	2.4±0.9	4.0±0.6a	5.1±0.5a	5.5±0.4	5.9±0.5

Los resultados se expresan en log 10 ufc/ml, como la media aritmética ± la desviación estándar de las cuatro cepas.

a: significación estadística frente a tiempos inferiores ($p<0.05$)

TABLA 20.- EFECTO BACTERICIDA DE CUATRO VECES LA CMI DE CIPROFLOXACINO FRENTE A CEPAS DE Escherichia coli.

Tiempo de exposición.

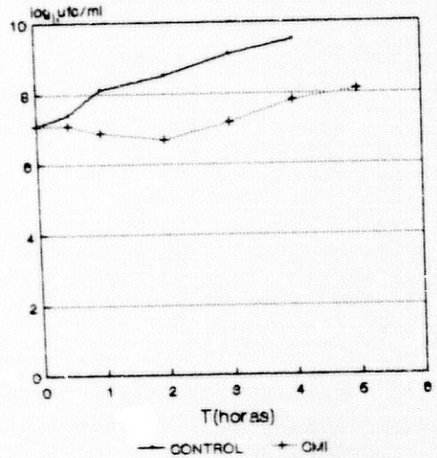
Cepa	0.5	1	2	3	4	5
HC - 5	2.7	5.2	6.5	7.0	8.3	
HC - 9	2.6	5.4	7.0	8.5	>9	>9
HC -11	2.5	5.0	6.0	7.2	8.0	>9
HC -14	2.8	5.9	7.0	8.2	>9	>9
M±DE	2.6±0.1	5.4±0.4a	6.6±0.4a	7.7±0.6a	-	-

Los resultados se expresan en log 10 ufc/ml, como la media aritmética ± la desviación estándar de las cuatro cepas.

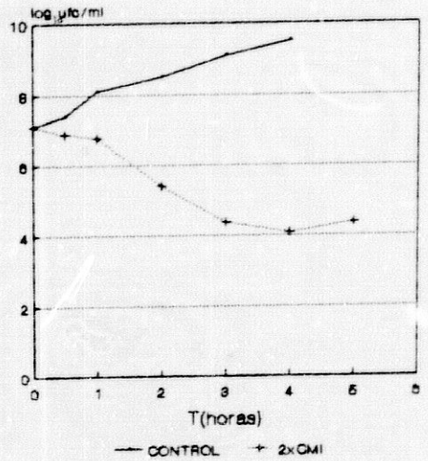
a: significación estadística frente a tiempos inferiores ($p<0.05$)

FIFURA 13.- EFECTO BACTERICIDA DE VARIAS CONCENTRACIONES DE A. NALIDIXICO FRENTE A *E. coli* HC-5.

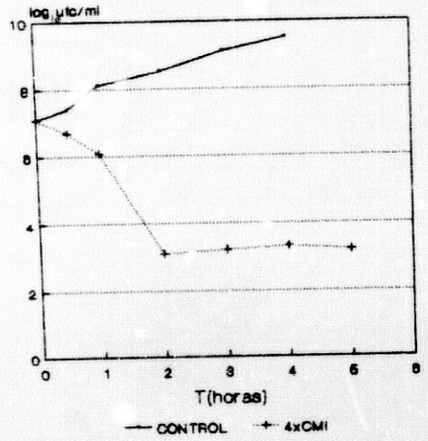
CMI



2 x CMI



4 x CMI



8 x CMI

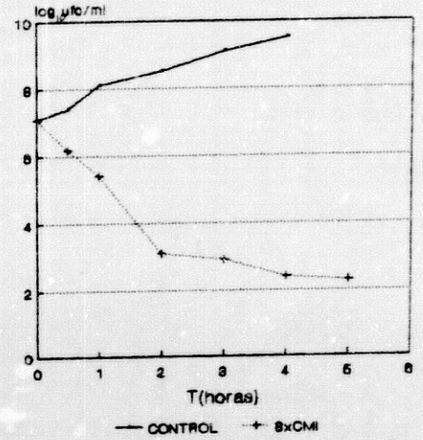


FIGURA 14.- EFECTO BACTERICIDA DE VARIAS CONCENTRACIONES DE NORFLOXACINO FRENTE *E. coli* HC-5.

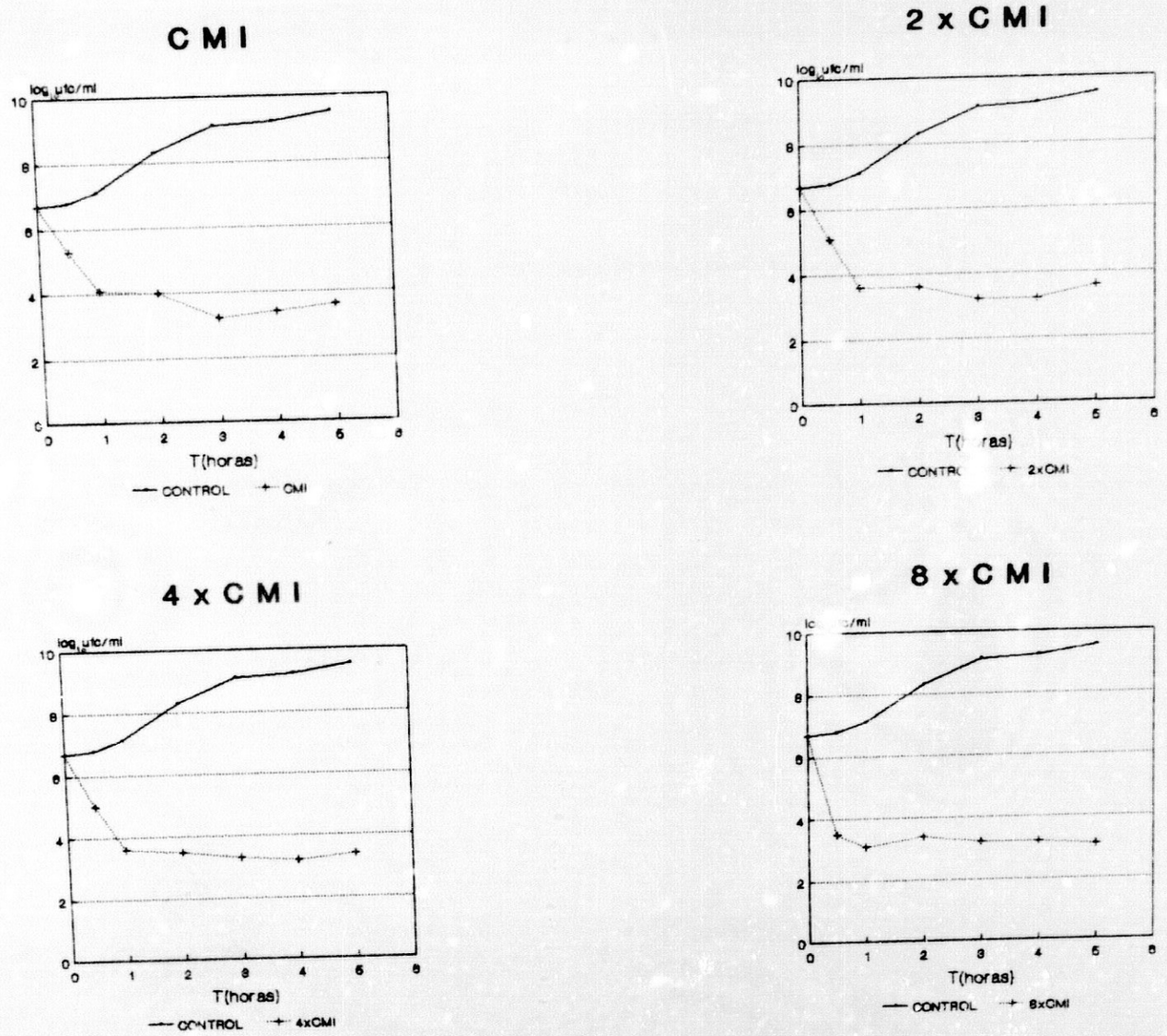
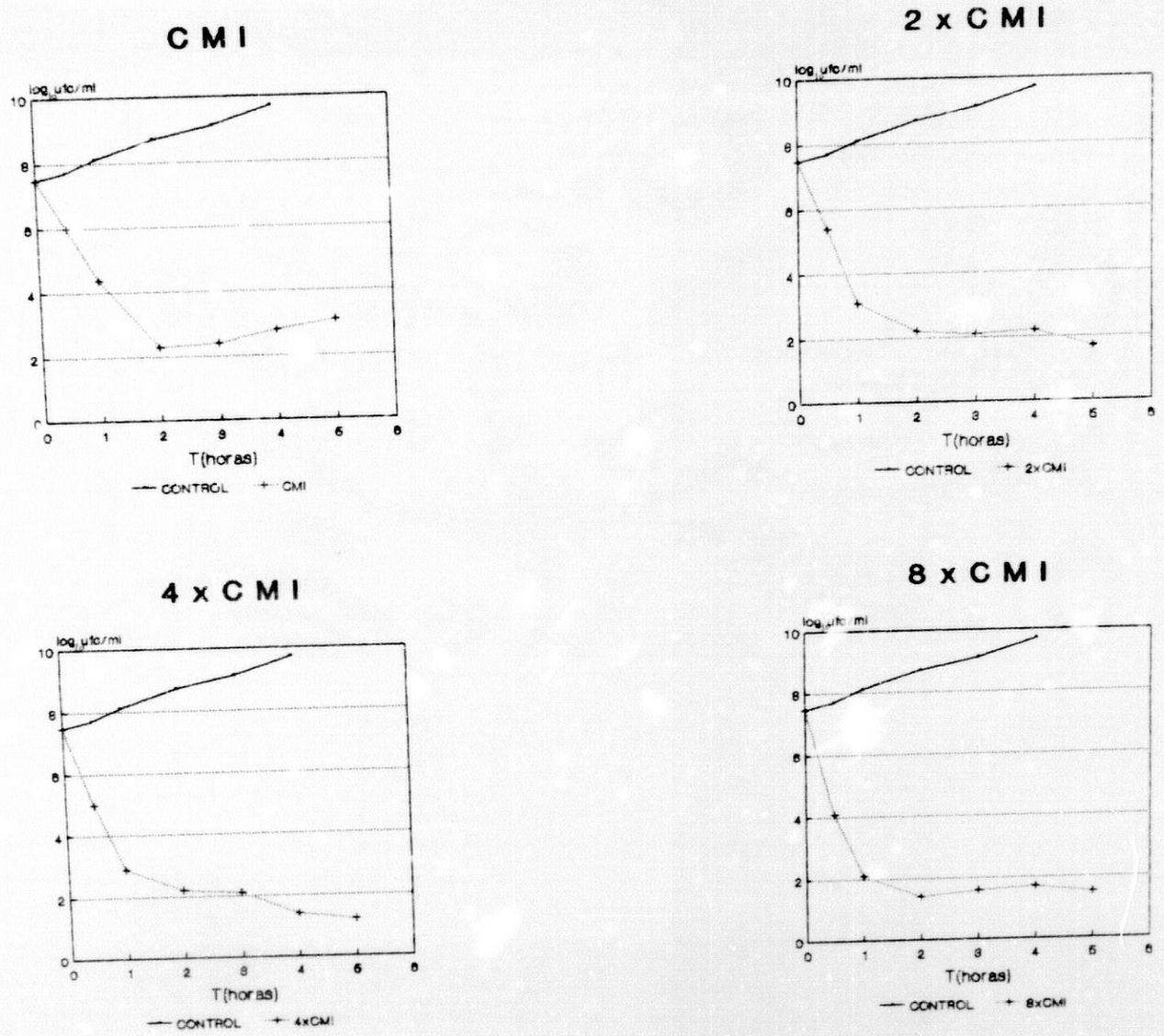


FIGURA 15.- EFECTO BACTERICIDA DE VARIAS CONCENTRACIONES DE CIPROFLOXACINO FRENTE A *E. coli* HC-5.



PSEUDOMONAS AERUGINOSA.

El EB en el tiempo de norfloxacino y ciprofloxacino se muestra, respectivamente, en las tablas 21-22. Ciprofloxacino presentó un EB mayor durante todo el seguimiento, aunque no existieron diferencias estadísticamente significativas entre ambos. Norfloxacino ejerció un EB con una más rápida tendencia a la estabilización (sin aumentos significativos) al compararlo con ciprofloxacino, el cual reveló incrementos estadísticamente significativos de forma progresiva hasta la cuarta hora de exposición.

Las figuras 16-17 reflejan las curvas de letalidad de P. aeruginosa HC-40 tras exposición a distintas concentraciones de norfloxacino y ciprofloxacino. Se observa claramente una dependencia del efecto letal con la concentración. Ciprofloxacino se mostró más activo de forma que tras tres horas de exposición el numero de bacterias viables/ml fué inferior a diez.

TABLA 21.- EFECTO BACTERICIDA DE CUATRO VECES LA CMI DE NORFLOXACINO FRENTE A CEPAS DE Pseudomonas aeruginosa.

	Tiempo de exposición.					
Conc.	0.5	1	2	3	4	5
HC - 40	1.5	3.3	4.4	5.3	6.9	8.6
HC - 46	1.8	4.2	5.0	6.6	7.0	7.4
HC - 58	1.6	3.5	6.8	7.6	8.3	9.1
HC - 60	1.6	3.7	5.8	7.1	8.0	8.9
M±DE	1.6±0.1	3.7±0.4a	5.5±1.0a	6.6±1.0	7.5±0.7	8.5±0.8

Los resultados se expresan en log 10 ufc/ml, como la media aritmética ± la desviación estándar de las cuatro cepas.

a: significación estadística frente a tiempos inferiores ($p<0.05$)

TABLA 22.- EFECTO BACTERICIDA DE CUATRO VECES LA CMI DE CIPROFLOXACINO FRENTE A CEPAS DE Pseudomonas aeruginosa.

	Tiempo de exposición.					
Conc.	0.5	1	2	3	4	5
HC - 40	2.3	4.8	6.2	7.3	8.8	10.4
HC - 46	2.2	5.1	6.2	7.0	7.7	8.6
HC - 58	1.4	2.9	7.0	8.0	8.8	9.8
HC - 60	1.9	3.5	5.9	6.9	8.1	9.3
M±DE	1.9±0.4	4.1±1.0a	6.3±0.5a	7.3±0.5a	8.3±0.5a	9.4±0.6

Los resultados se expresan en log 10 ufc/ml, como la media aritmética ± la desviación estándar de las cuatro cepas.

a: significación estadística frente a tiempos inferiores ($p<0.05$)

FIGURA 16.- EFECTO BACTERICIDA DE VARIAS CONCENTRACIONES DE NORFLOXACINO FRENTE A *P. seruginosa* HC-46.

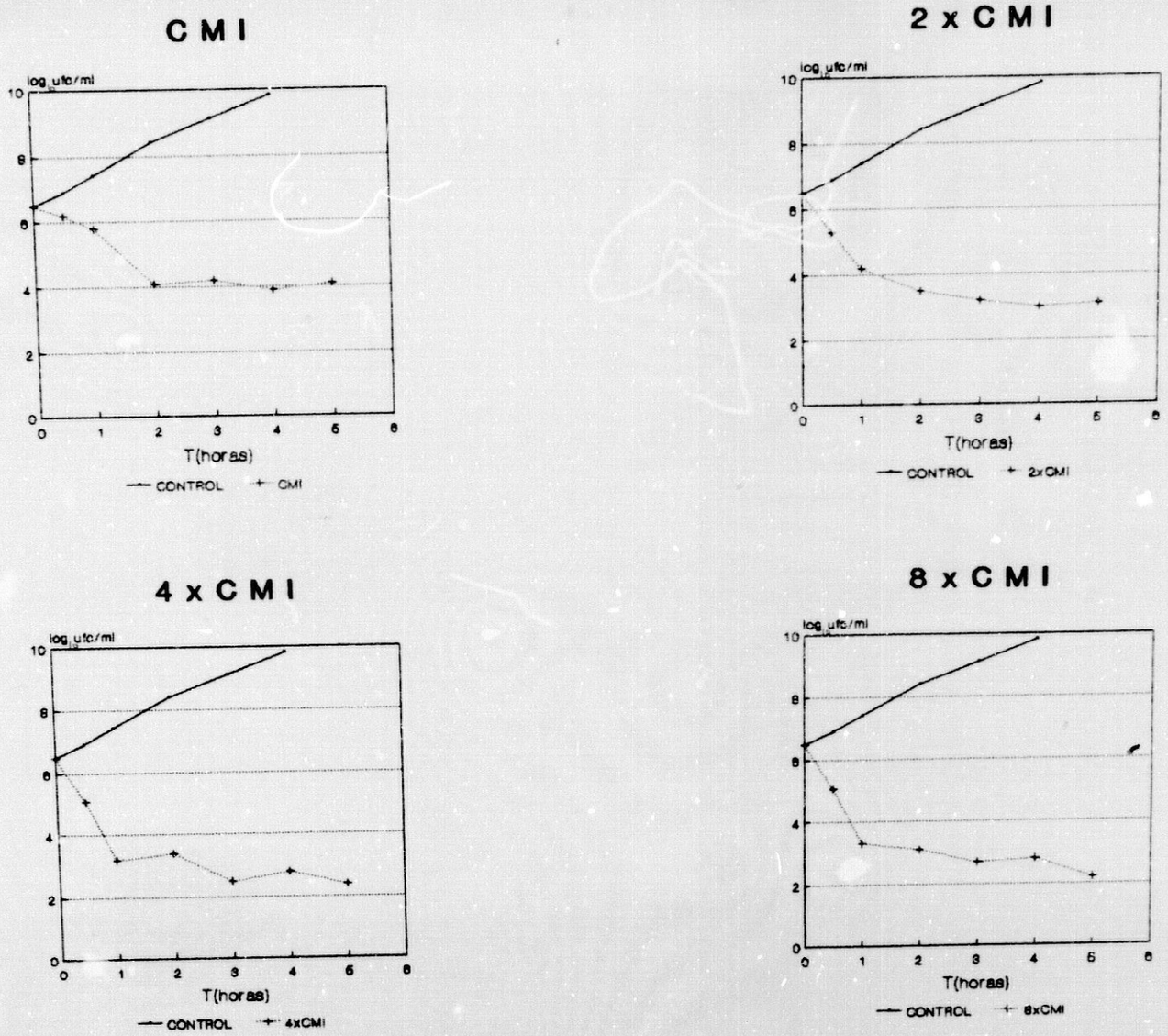
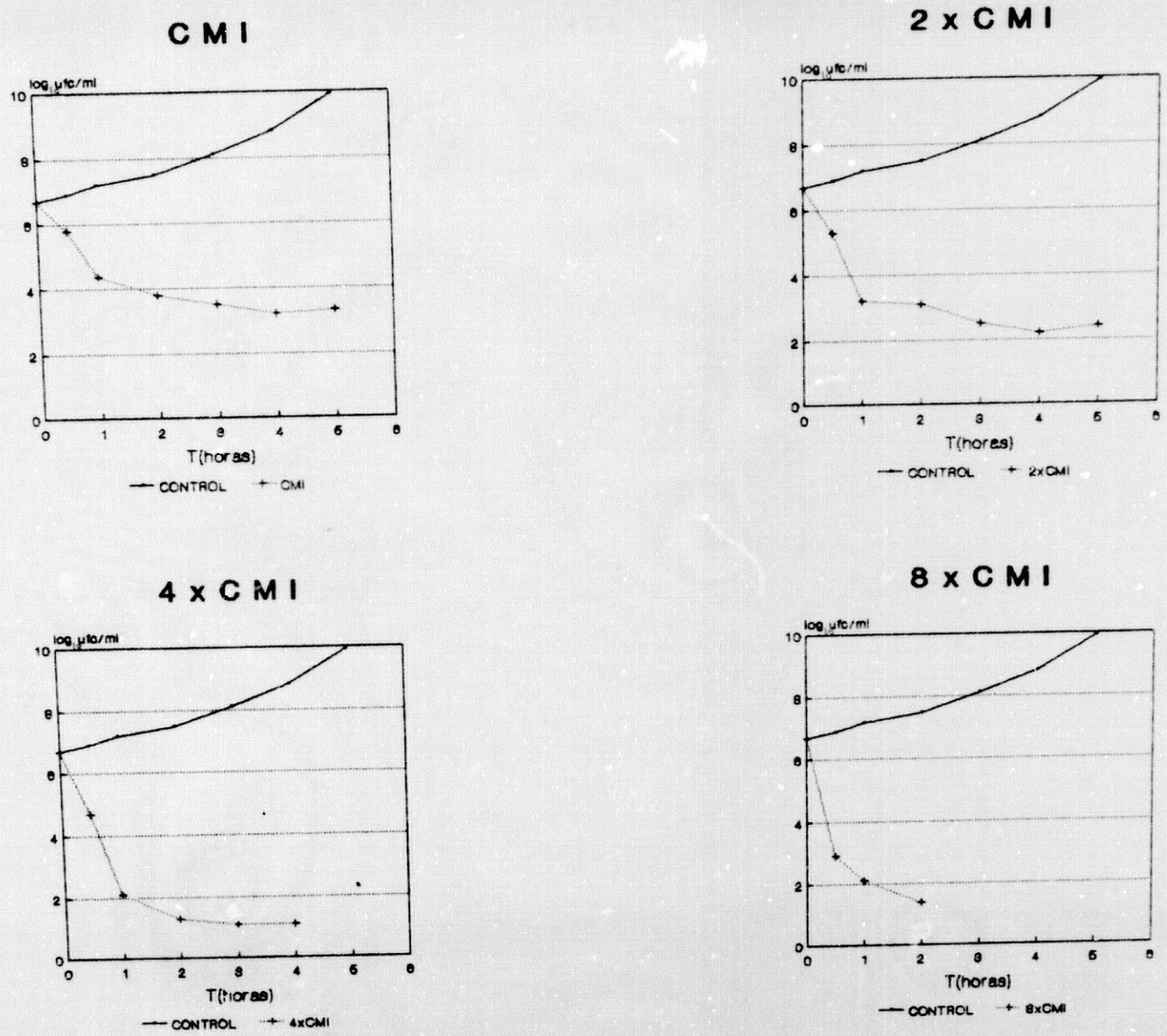


FIGURA 17.- EFECTO BACTERICIDA DE VARIAS CONCENTRACIONES DE CIPROFLOXACINO FRENTE A *P. aeruginosa* HC-46.



3.3.4.- ESTUDIO DEL EFECTO POSTANTIBIOTICO DE A. NALIDIXICO, NORFLOXACINO Y CIPORFLOXACINO

SHIGELLA SONNEI

Las figuras 18-29 reflejan el efecto postantibiótico (EPA) tras una hora de exposición a distintintas concentraciones (CMI, 2, 4 y 8 veces ésta) de a. nalidíxico, norfloxacino y ciprofloxacino. Se observa como en los tres fármacos existe una dependencia directa del efecto con la concentración. Cabe destacar que ciprofloxacino ejerce un menor EPA que norfloxacino, aunque sólo se detectaron diferencias estadísticamente significativas a concentraciones 2 y 4 veces la CMI (tabla 23).

Se estudió la influencia del tiempo de exposición sobre el EPA en la cepa HC-13, observandose, de forma análoga a la anteriormente descrita, una clara diferenciación entre ciprofloxacino y las otras dos quinolonas así, estas últimas parecen alcanzar un máximo efecto entre 4-8 CMI's, que se afecta poco por el incremento de la exposición de una a dos horas (Fig. 30-31). Por el contrario, ciprofloxacino ejerce un efecto intimamente ligado al tiempo exposición, hecho que se hace más patente al aumentar la concentración por encima de la mínima inhibitoria (Fig. 32). Cabe destacar que el EPA de ciprofloxacino, menor en un pricipio al de norfloxacino, se hace comparable al de éste al incrementar concentración y periodo de exposición.

TABLA 23- EFECTO POSTANTIBIOTICO (EPA) DE AC. NALIDIXICO, NORFLOXACINO Y CIPROFLOXACINO FRENTE A Shigella sonnei.

	Concentración			
Antimicrobiano	CMI	2xCMI	4xCMI	8xCMI
A. NALIDIXICO	0.4±0.1	1.3±0.5b	1.6±0.3	1.7±0.1
NORFLOXACINO	0.7±0.3	2.0±0.6ab	2.6±0.9a	2.9±1.0
CIPROFLOXACINO	0.4±0.2	1.0±0.1b	1.4±0.2b	2.4±0.1*,b

Los resultados se expresan en horas, como media ± desviación estándar.

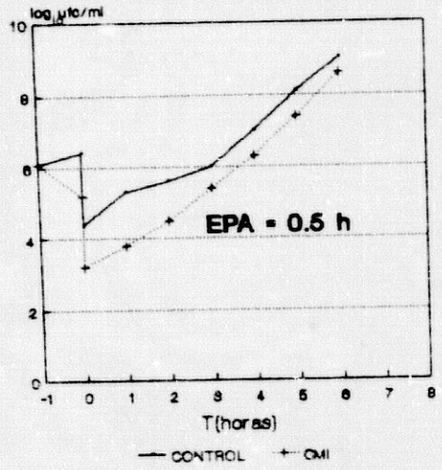
(*): media de los valores de sólo dos cepas.

a: significación estadística frente a ciprofloxacino ($p<0.05$).

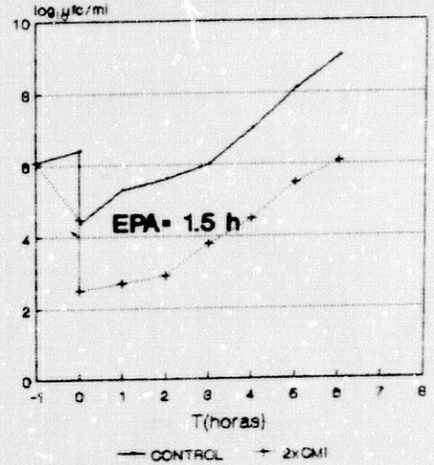
b: " " " " concentraciones menores ($p<0.05$).

FIGURA 18.- EFECTO POSTANTIBIOTICO DE A. NALIDIXICO FRENTE A *S. sonnei* HC-13.

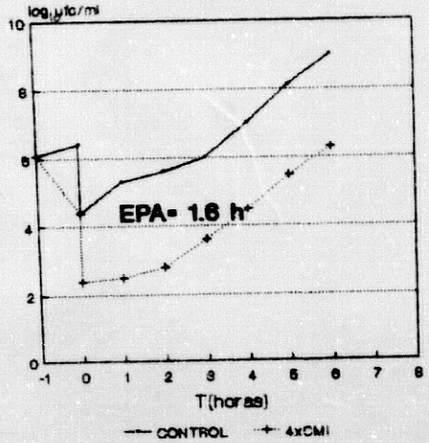
C M I



2 x C M I



4 x C M I



8 x C M I

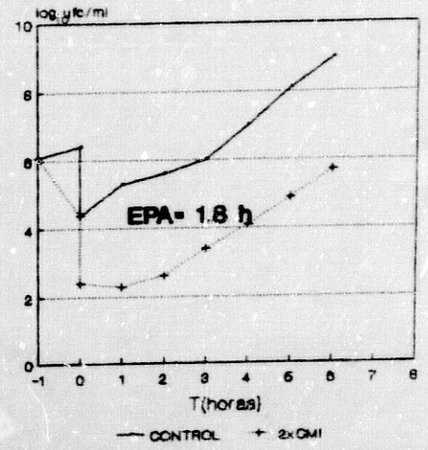


FIGURA 19.- EFECTO POSTANTIBIOTICO DE A. NALIDIXICO FRENTE A *S. somnei* HC-126.

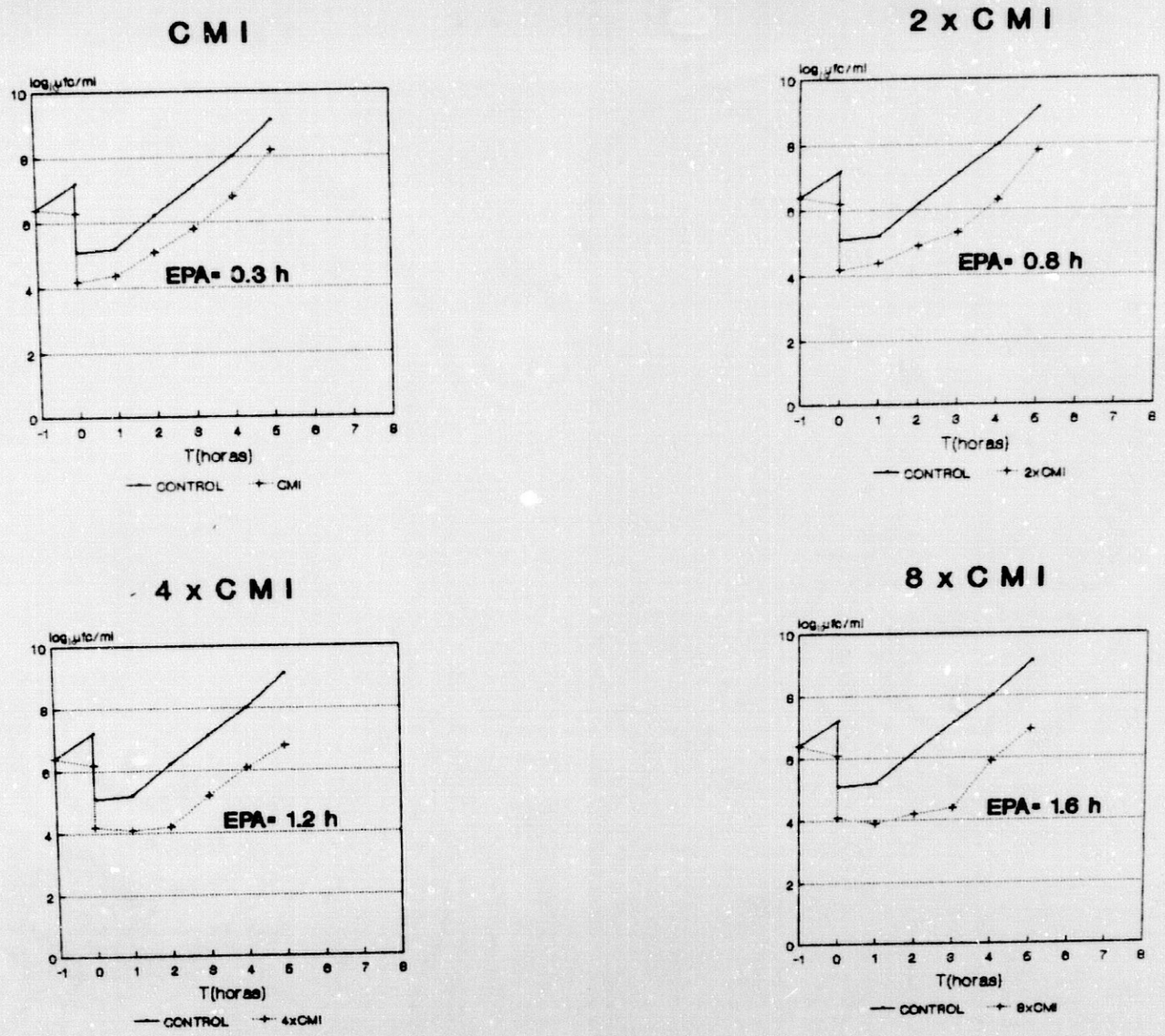


FIGURA 20.- EFECTO POSTANTIBIOTICO DE A. NALIDIXICO FRENTE A *S. connei* HC-231

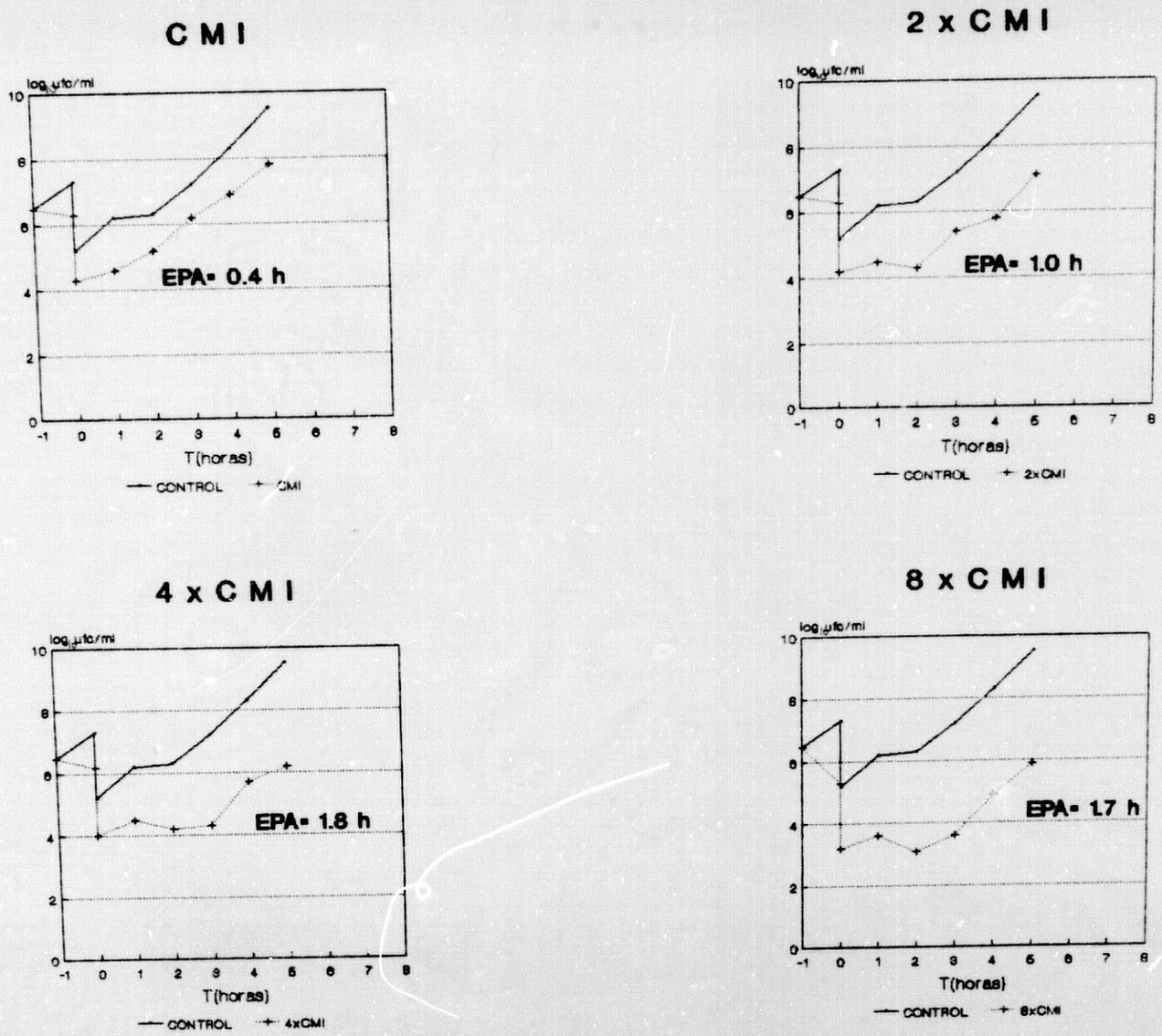


FIGURA 21.- EFECTO POSTANTIBIOTICO DE A. NALIDIXICO FRENTE A *S. sonnei* HC-232.

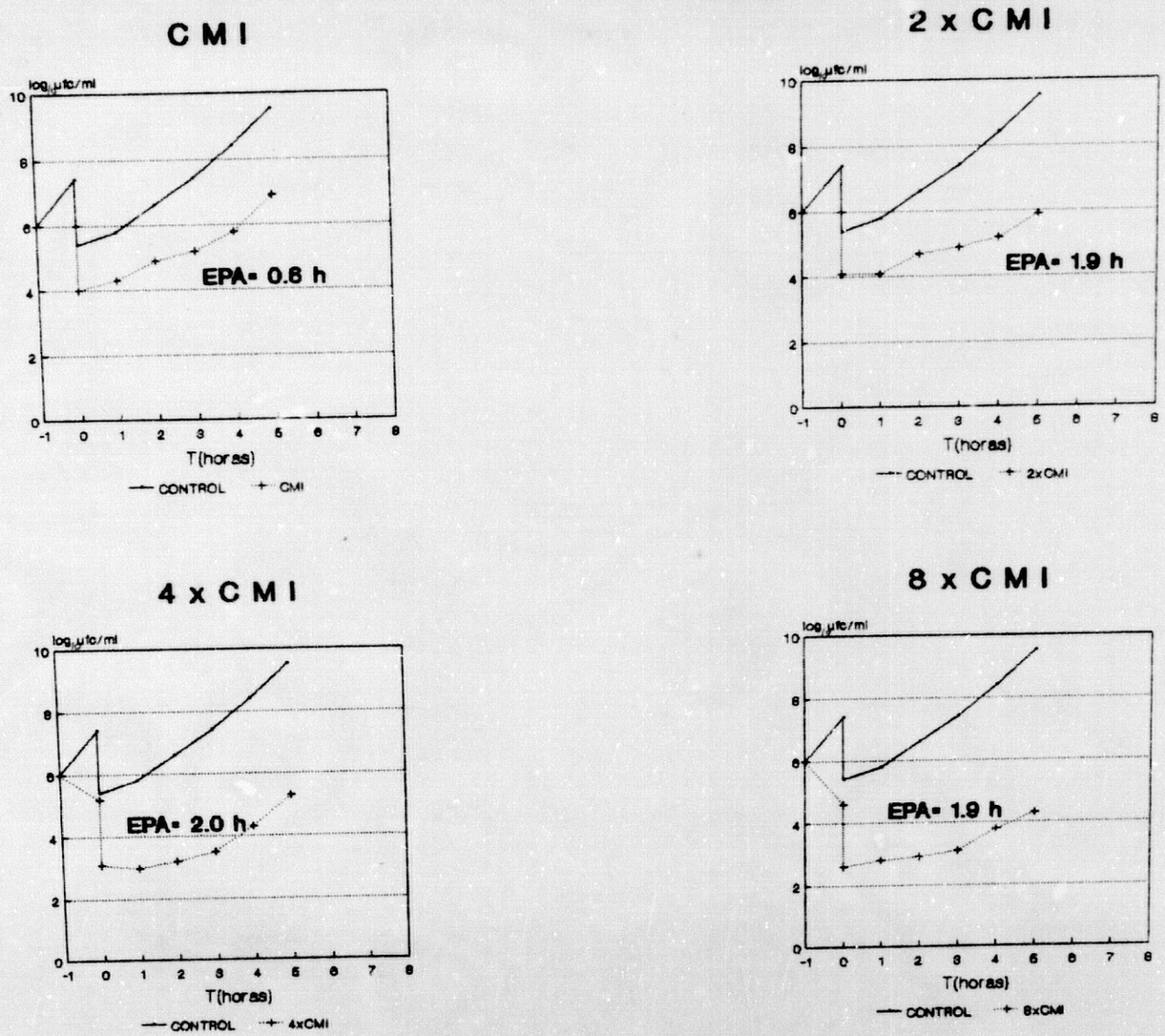


FIGURA 22.- EFECTO POSTANTIBIOTICO DE NORFLOXACINO FRENTE A *S. sonnei* HC-13.

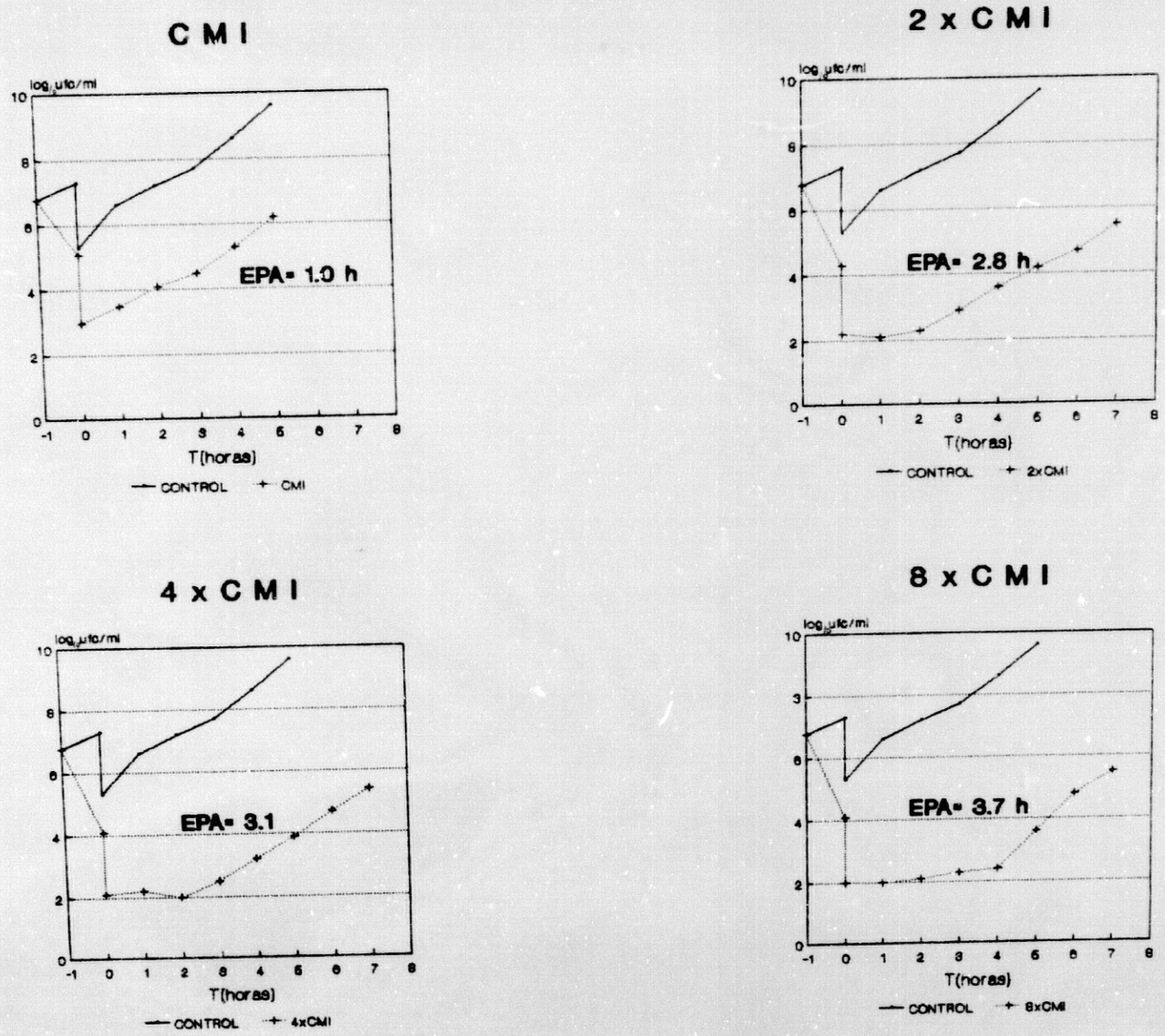


FIGURA 23.- EFECTO POSTANTIBIOTICO DE NORFLOXACINO FRENTE A *S. sonnei* HC-126.

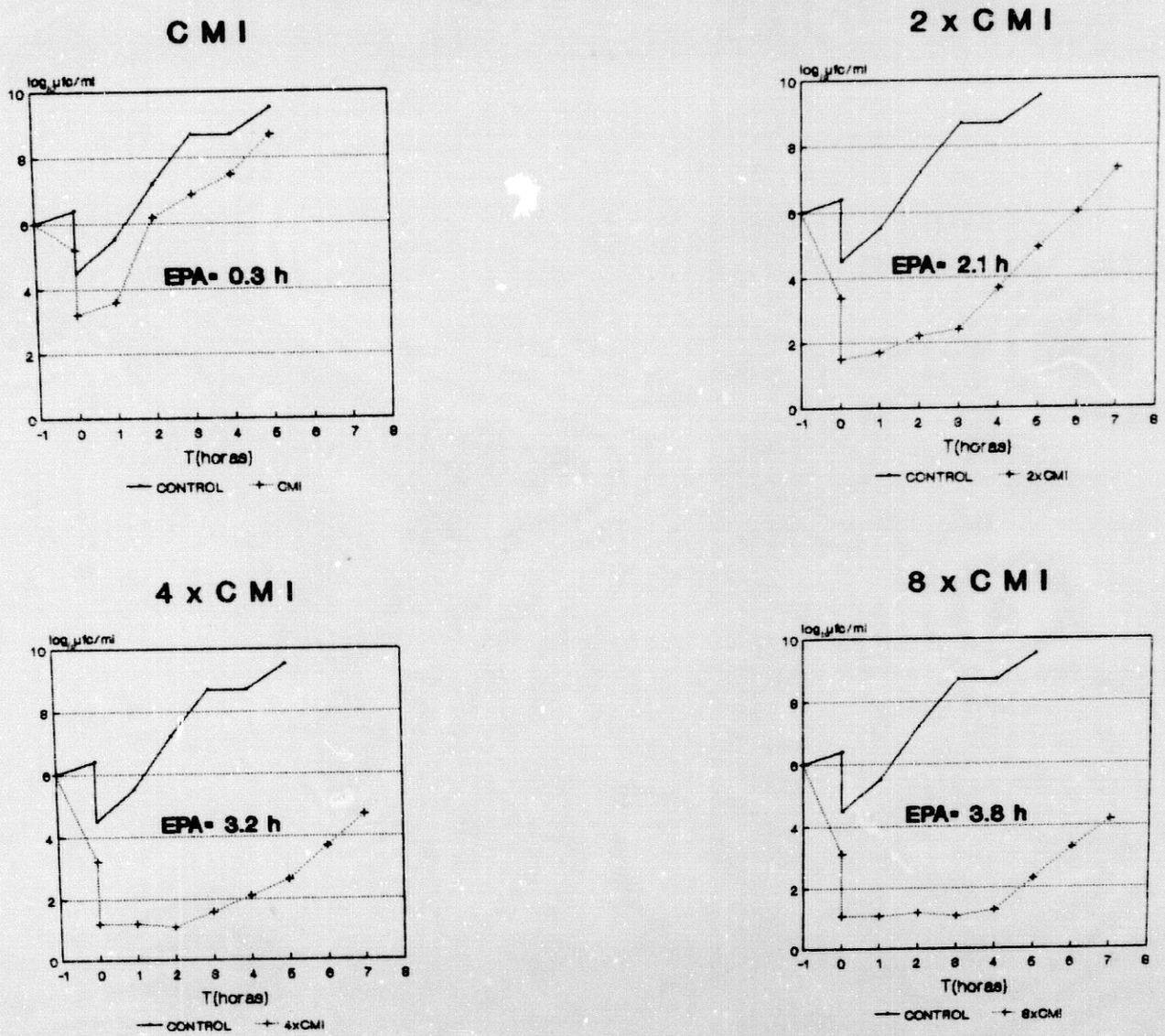
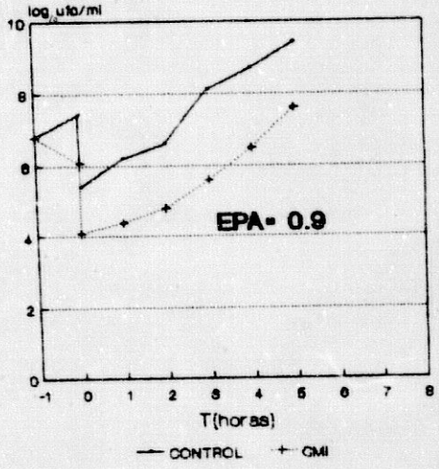
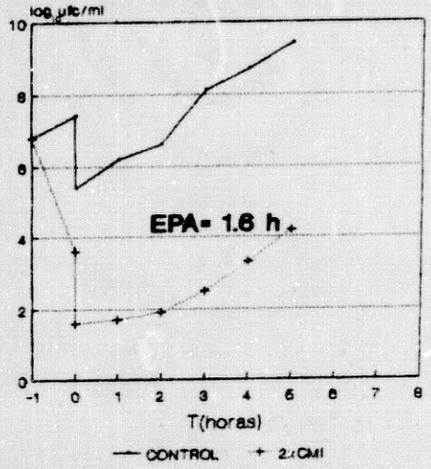


FIGURA 24.- EFECTO POSTANTIBIOTICO DE NORFLOXACINO FRENTE A *S. sonnei* HC-231.

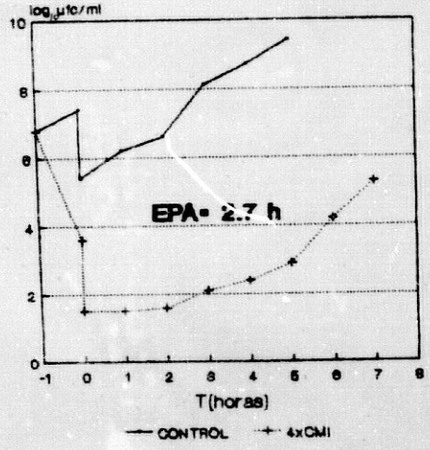
C M I



2 x C M I



4 x C M I



8 x C M I

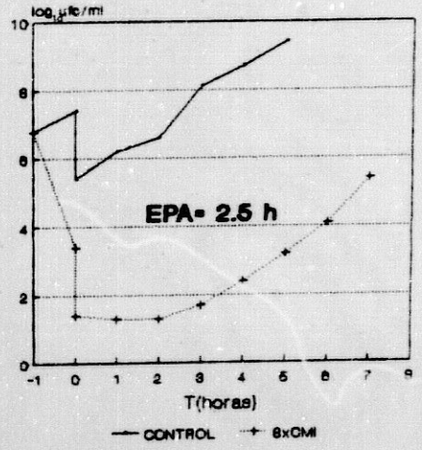
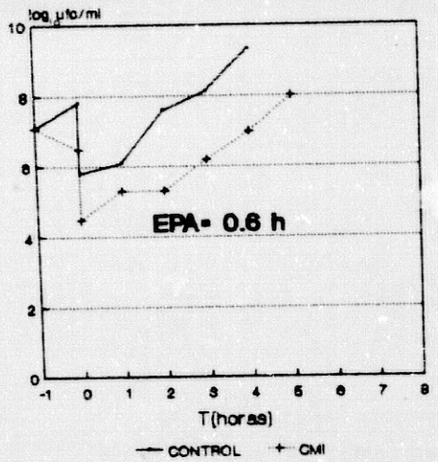
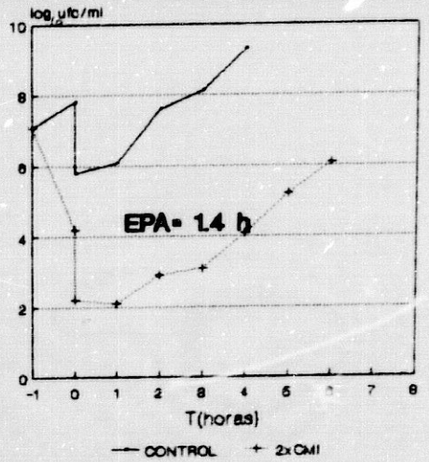


FIGURA 25.- EFECTO POSTANTIBIOTICO DE NORFLOXACINO FRENTE A *S. sonnei* HC-232.

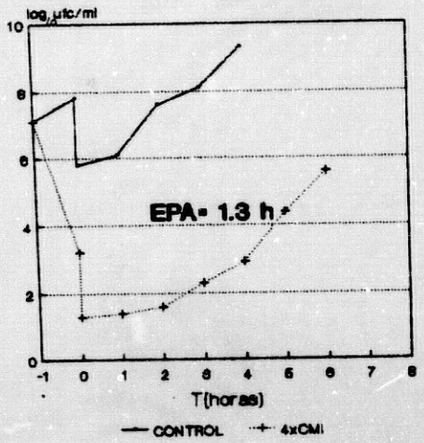
CMI



2 x CMI



4 x CMI



8 x CMI

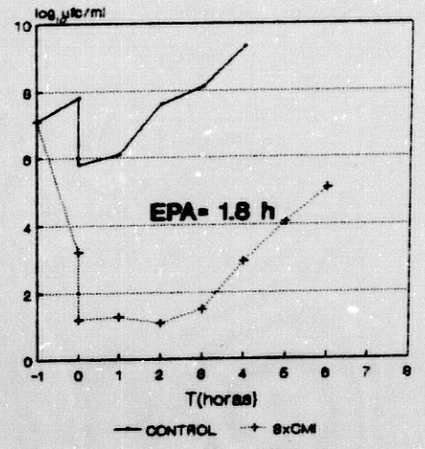


FIGURA 26.- EFECTO POSTANTIBIOTICO DE CIPROFLOXACINO FRENTE A *S. comnol* HC-13.

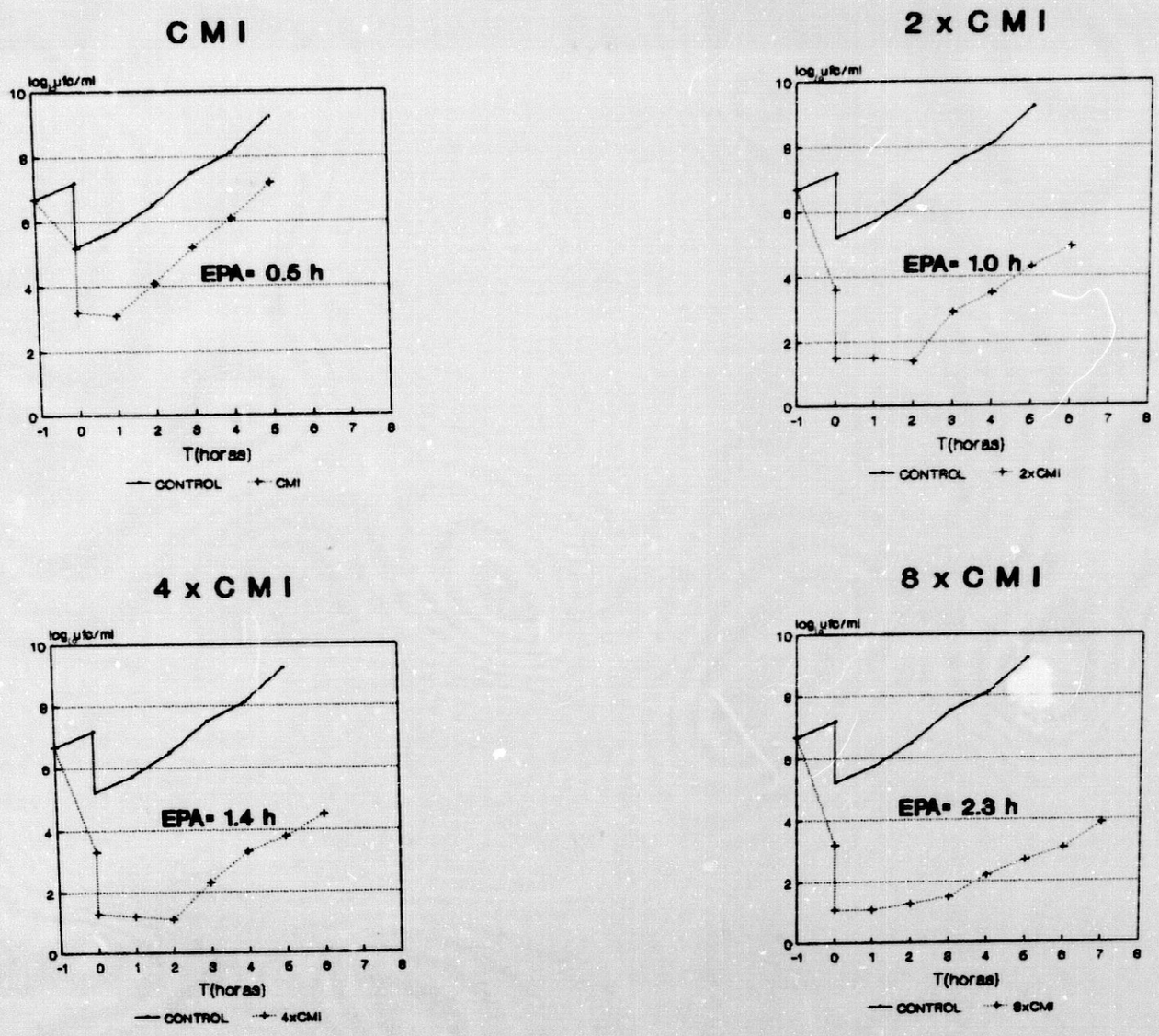
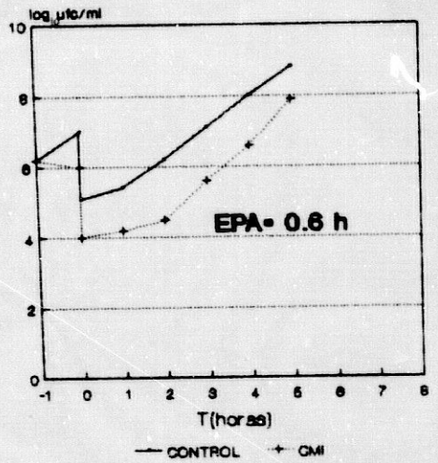
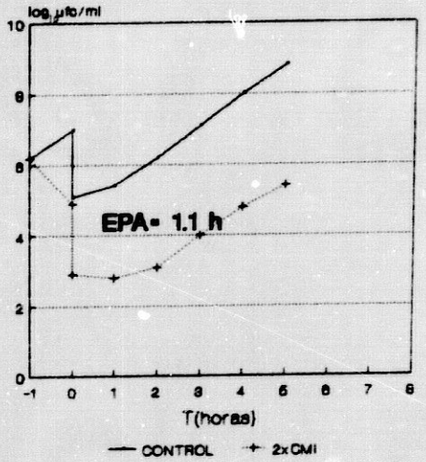


FIGURA 27.- EFECTO POSTANTIBIOTICO DE CIPROFLOXACINO FRENTE A *S. sonnei* HC-126

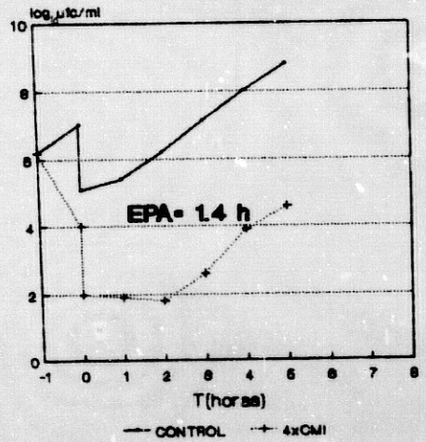
C M I



2 x C M I



4 x C M I



8 x C M I

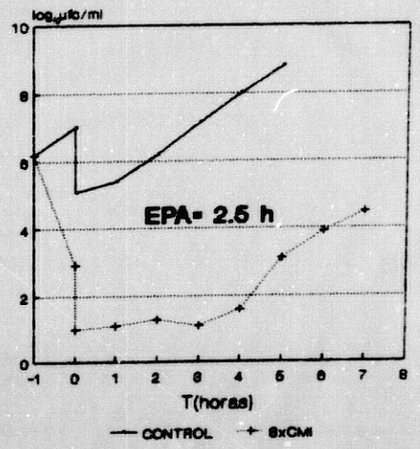


FIGURA 28.- EFECTO POSTANTIBIOTICO DE CIPROFLOXACINO FRENTE A *S. sonnei* HC-231

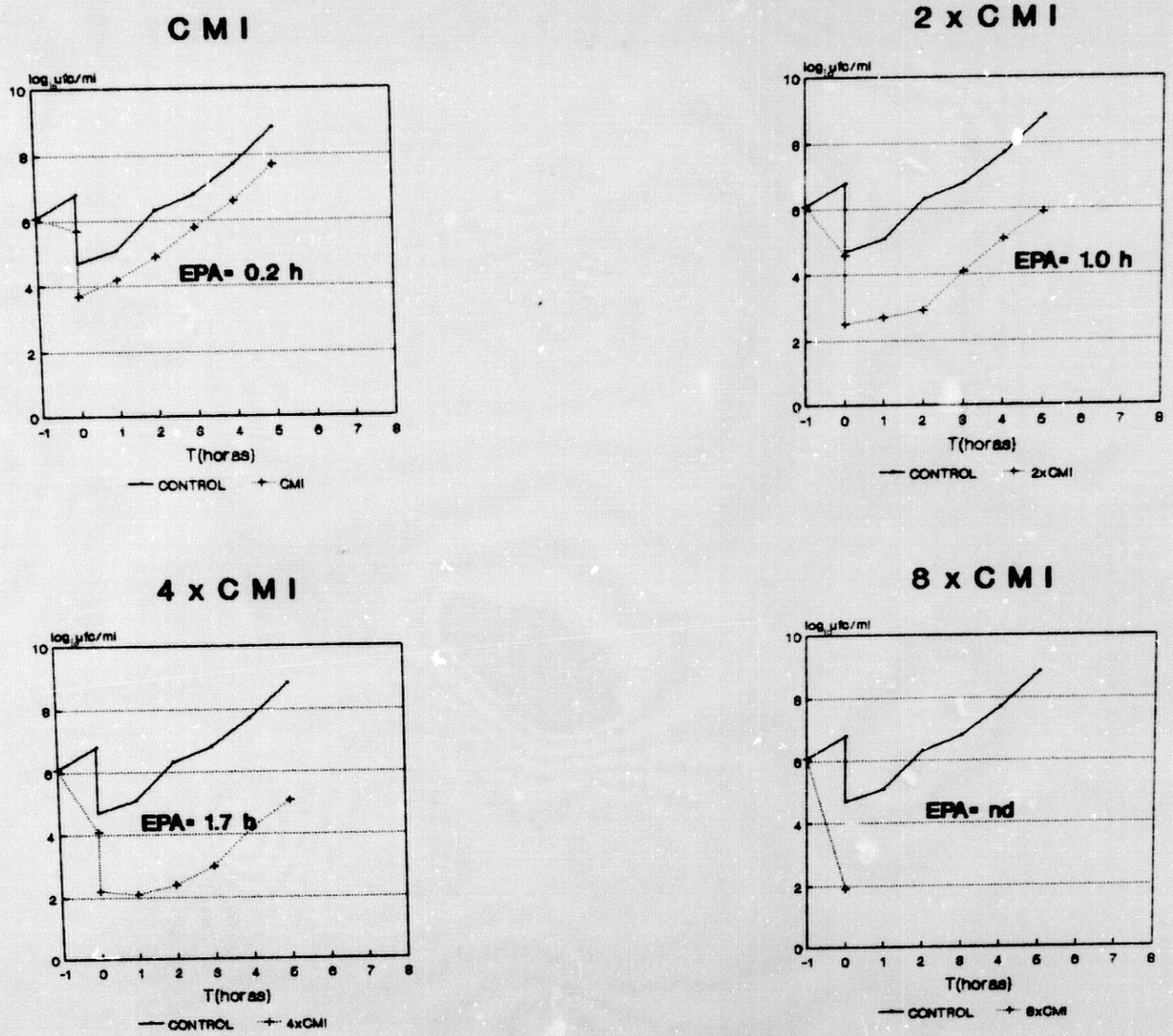


FIGURA 29.- EFECTO POSTANTIBIOTICO DE CIPROFLOXACINO FRENTE A *S. sonnei* HC-232

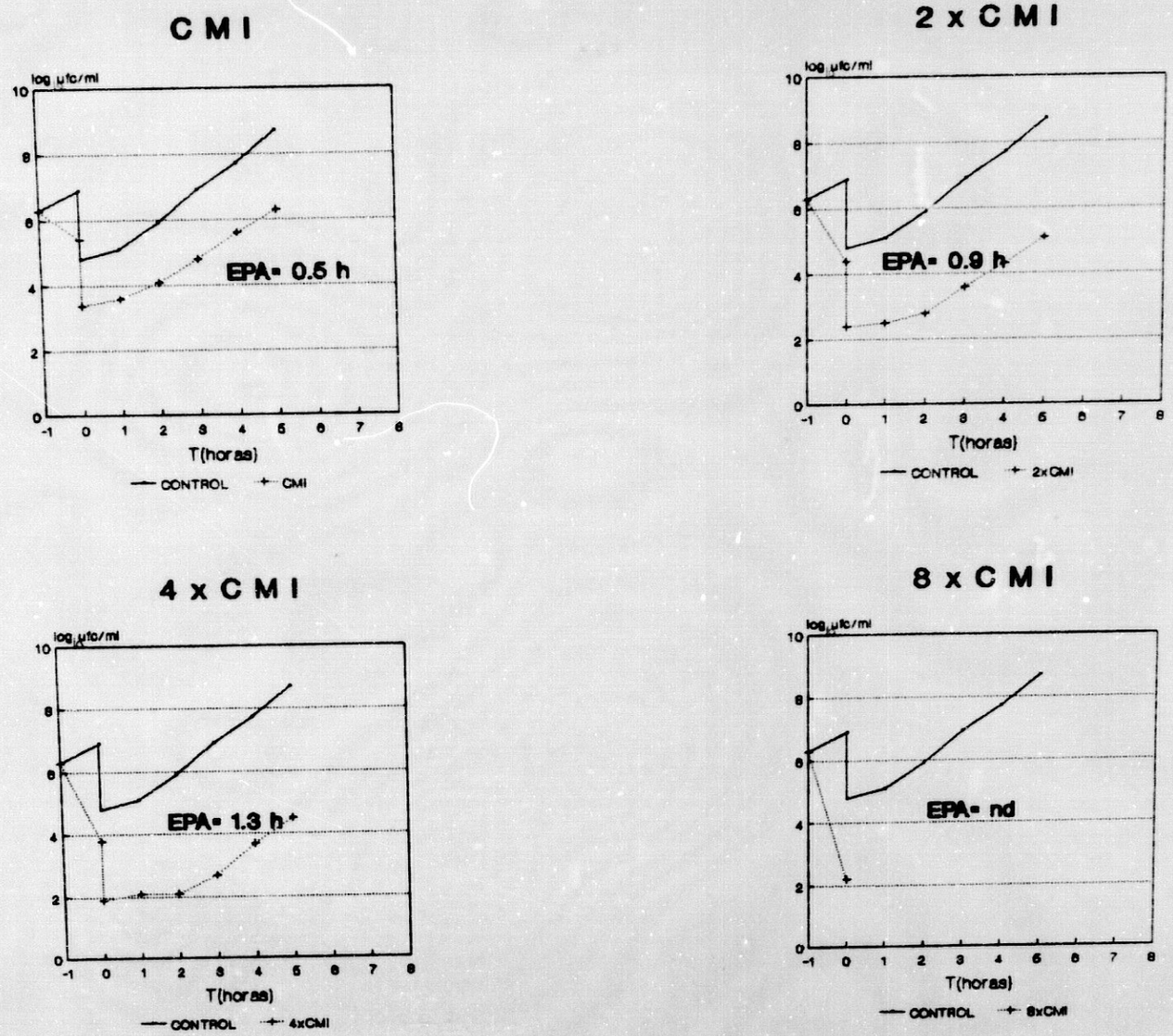


FIGURA 30.- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE EXPOSICIÓN SOBRE EL EPA DE NALIDIXICO FRENTE A S. schnoi HC-13.

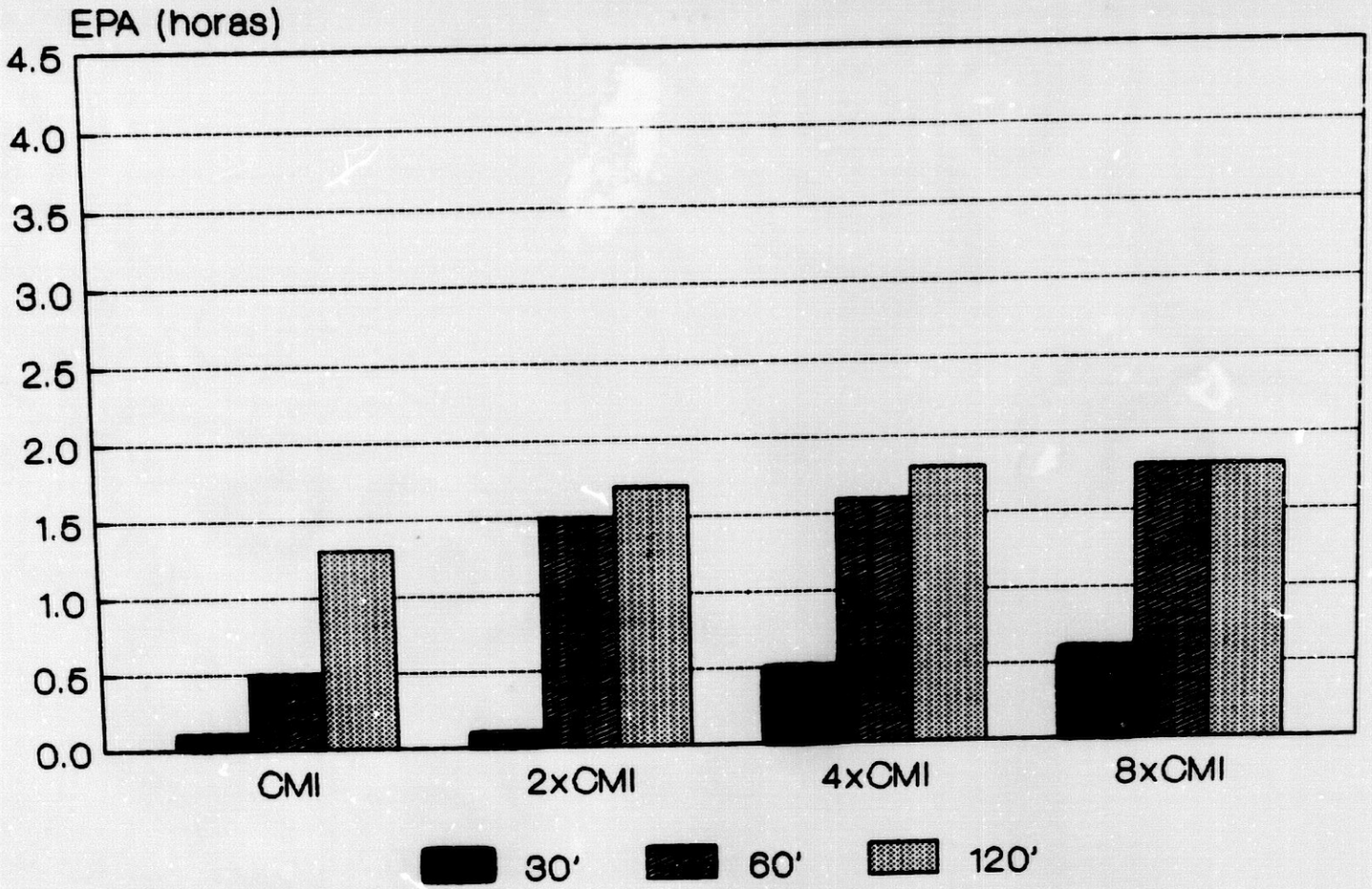


FIGURA 31.- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE EXPOSICION SOBRE EL EPA DE *NORFLOXACINO* FRENTE A *S. sonnei* HC-13

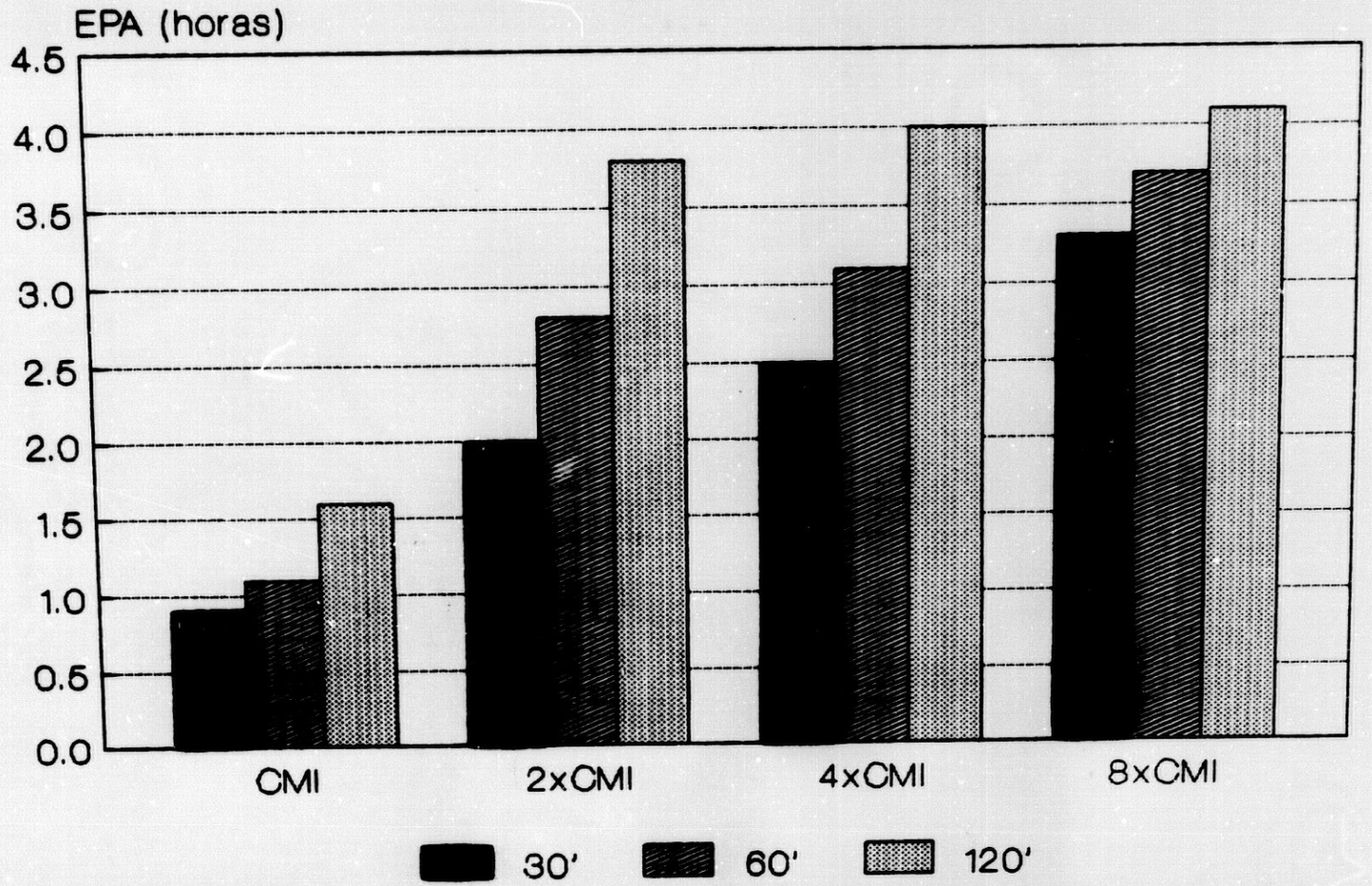
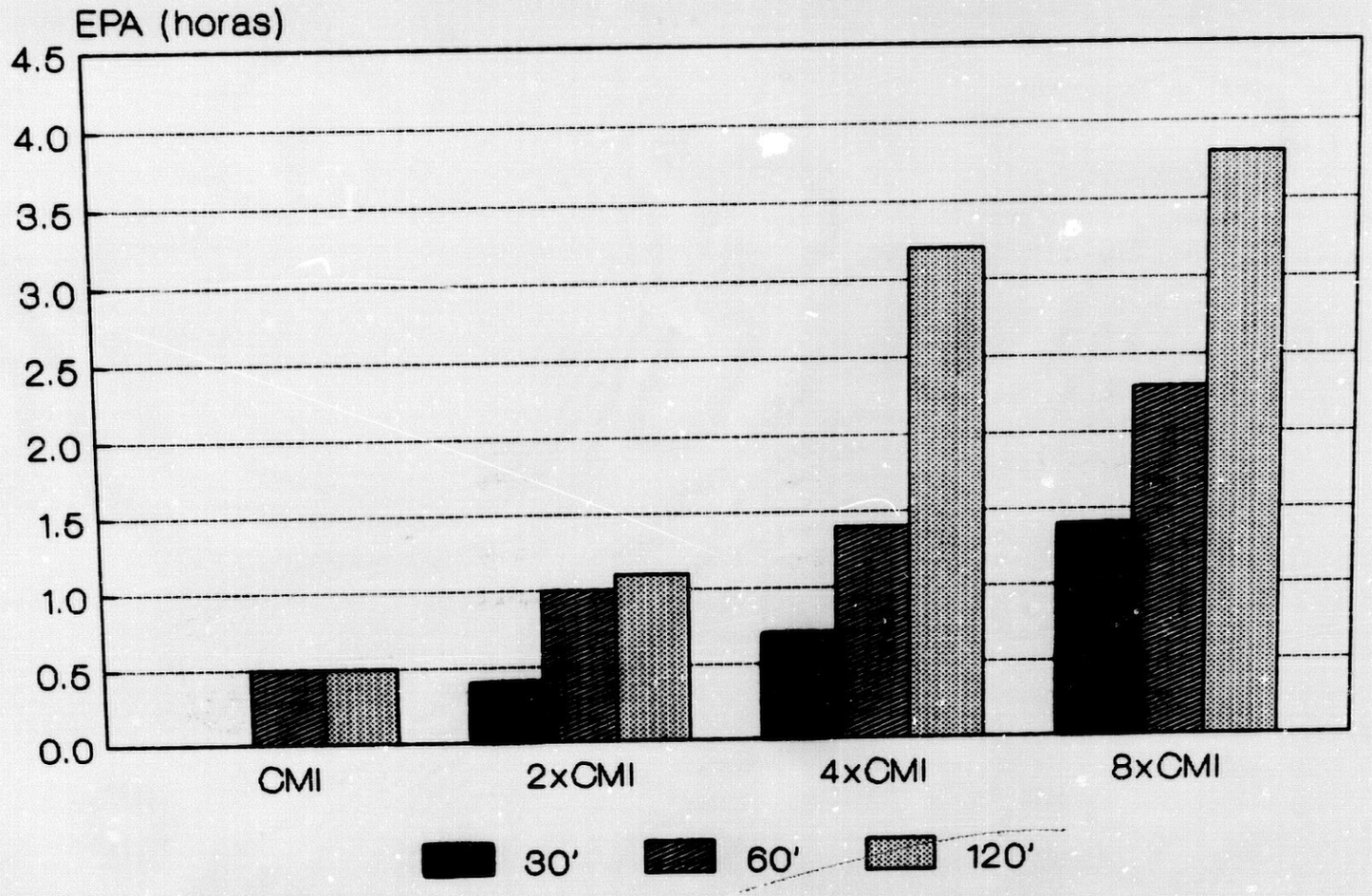


FIGURA 32.- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE EXPOSICION SOBRE EL EPA DE CIPROFLOXACINO FRENTE A *S. sonnei* HC-13



KLEBSIELLA PNEUMONIAE.

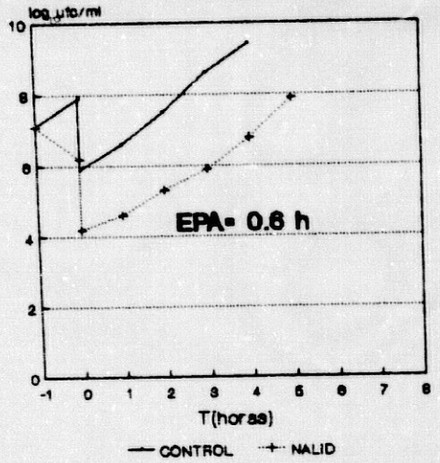
Las figuras 33-36 muestran los EPA's de concentraciones 4 veces la mínima inhibitoria de a. nalidíxico, norfloxacino y ciprofloxacino frente a las cuatro cepas estudiadas. Observamos que a. nalidíxco induce un escaso EPA (0.4±0.1 h.). Por el contrario se consiguen moderados efectos con norfloxacino (1.5±0.1 h.) y y mayores aún ($p<0.05$) con ciprofloxacino (2.4±0.6 h) (tabla 24).

Tanto concentración como tiempo de exposición, parecen influir poco en el EPA de nalidíxico; pero hemos de tener en cuenta que este fármaco induce escasos EPA's, no superando 0.8 horas al incrementar la concentración a ocho veces la CMI y el tiempo de exposición a dos horas (Fig. 37).

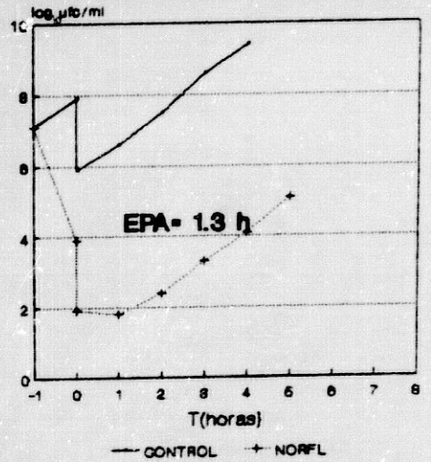
Norfloxacino y ciprofloxacino muestran a la vez que unos mayores EPA's, una mayor dependencia de los factores concentración y periodo de exposición, siendo de destacar que la influencia de este último factor se hace menor al aumentar la concentración (Fig. 38-39).

FIGURA 33.- EFECTO POSTANTIBIOTICO DE 4 VECES LA CMI DE TRES QUINOLONAS FRENTE A *K. pneumoniae* HC-776.

NALIDIXICO



NORFLOXACINO



CIPROFLOXACINO

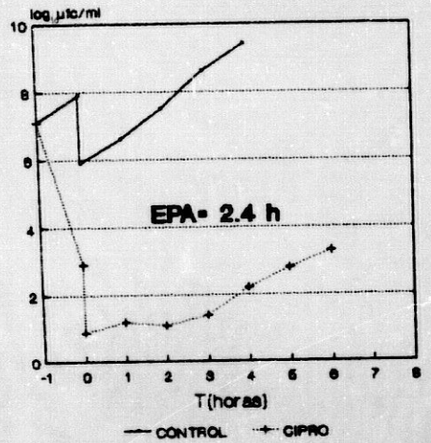
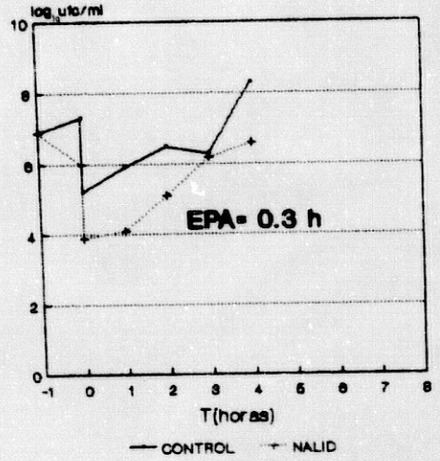
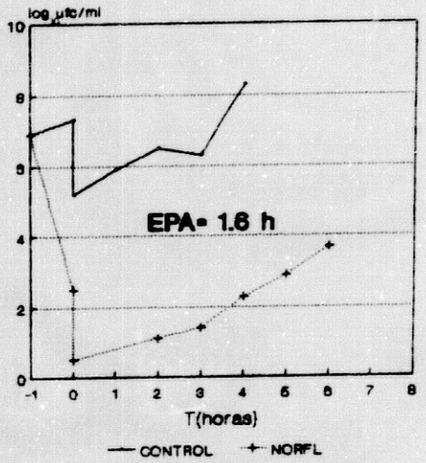


FIGURA 34.- EFECTO POSTANTIBIOTICO DE 4 VECES LA CMI DE TRES QUINOLONAS FRENTE A *K. pneumoniae* HC-712.

NALIDIXICO



NORFLOXACINO



CIPROFLOXACINO

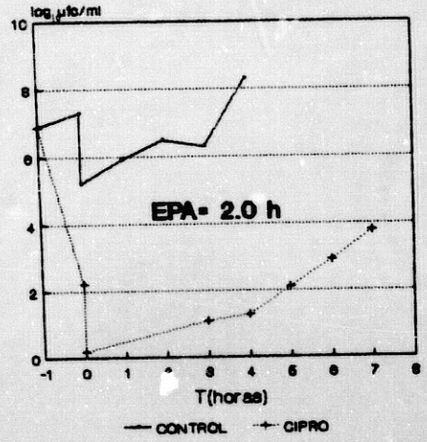
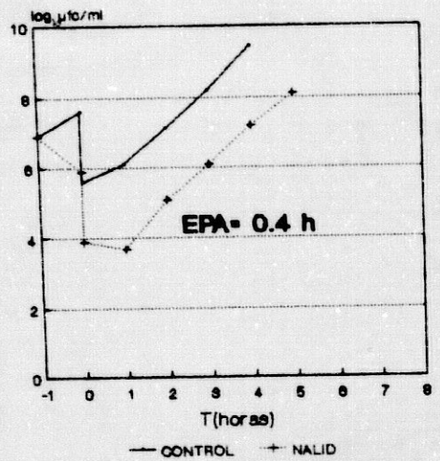
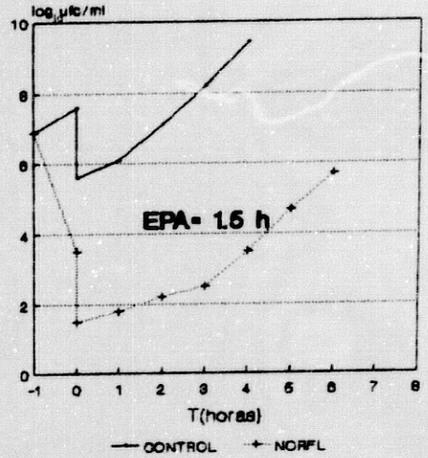


FIGURA 35.- EFECTO POSTANTIBIOTICO DE 4 VECES LA CMI DE TRES QUINOLONAS FRENTE A *K. pneumoniae* HC-257.

NALIDIXICO



NORFLOXACINO



CIPROFLOXACINO

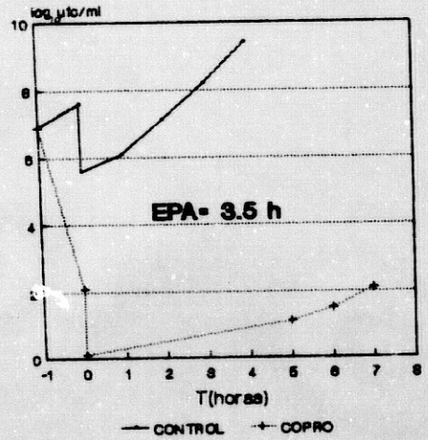
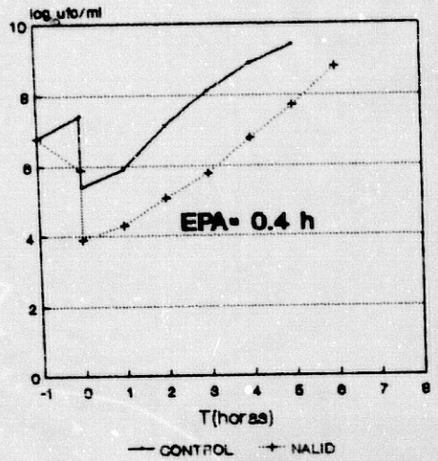
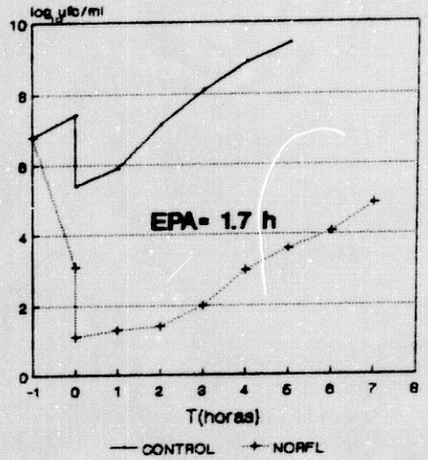


FIGURA 36.- EFECTO POSTANTIBIOTICO DE 4 VECES LA CMI DE TRES QUINOLONAS FRENTE A *K. pneumoniae* HC-791.

NALIDIXICO



NORFLOXACINO



CIPROFLOXACINO

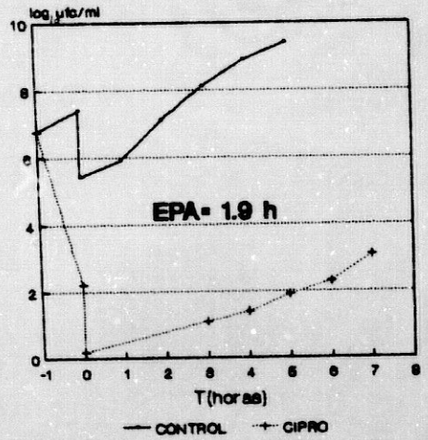


TABLA 24- EFECTO POSTANTIBIOTICO (EPA) DE AC. NALIDIXICO, NORFLOXACINO Y CIPROFLOXACINO FRENTE A Klebsiella pneumoniae EXPUESTAS A 4 VECES LA CMI.

	ANTIMICROBIANO		
Cepa	Ac. Nalid.	Norfloxac.	Ciprofloxac.
HC - 776	0.6	1.3	2.4
HC - 712	0.3	1.6	2.0
HC - 257	0.4	1.5	3.5
HC - 791	0.4	1.7	1.9
M±DE	0.4±0.1	1.5±0.1a	2.4±0.6ab

Los resultados se expresan en horas, como la media aritmética±la desviación estándar de las cuatro cepas.

a: significación estadística frente a a. nalidíxico.

b: " " " " norfloxacino.

FIGURA 37.- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE EXPOSICION SOBRE EL EPA DE NALIDIXICO FRENTE A *K. pneumoniae* HC-776

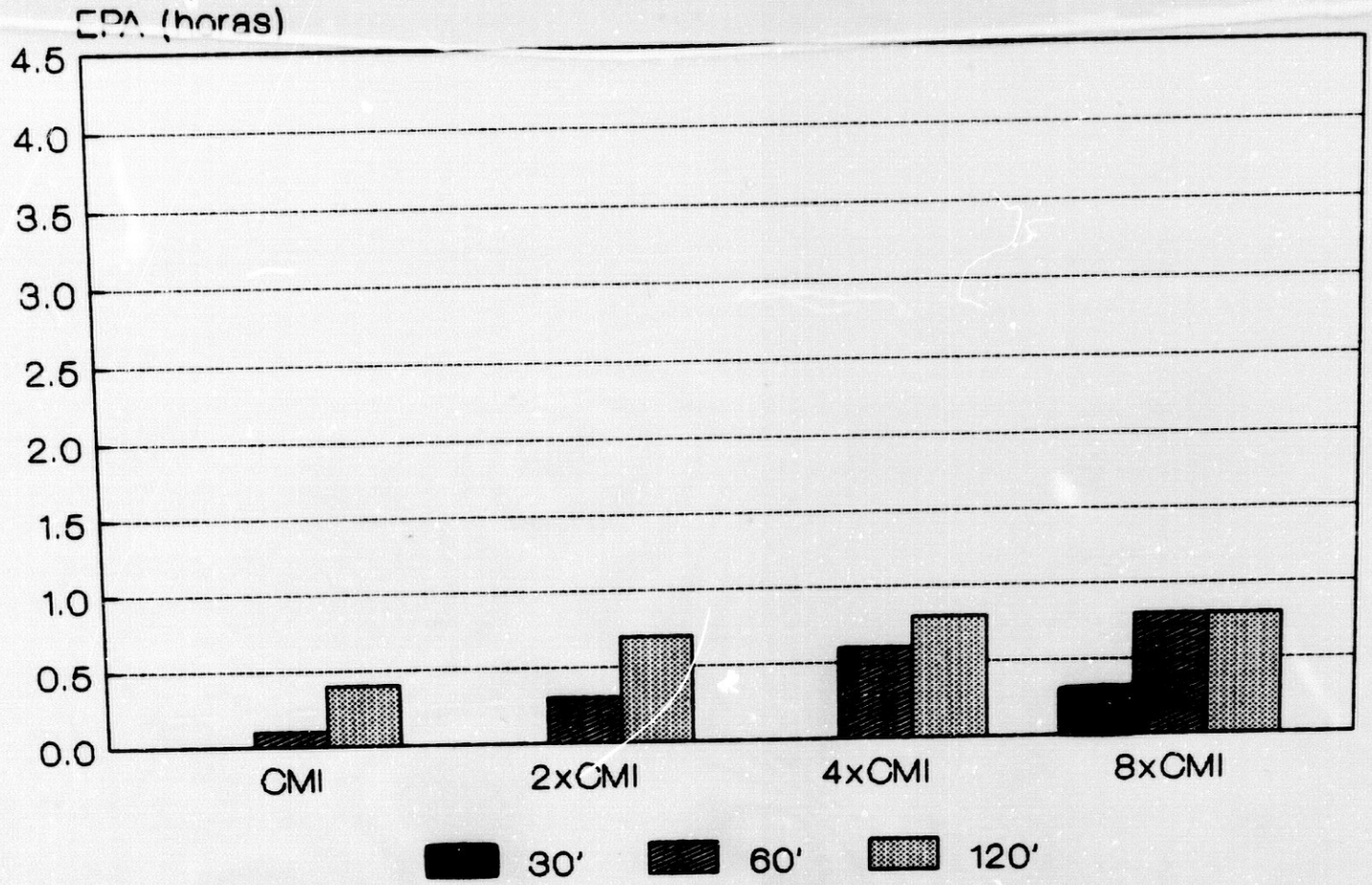


FIGURA 38.- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE EXPOSICION SOBRE EL EPA DE NORFLOXACINO FRENTE A *K. pneumoniae* HC-776

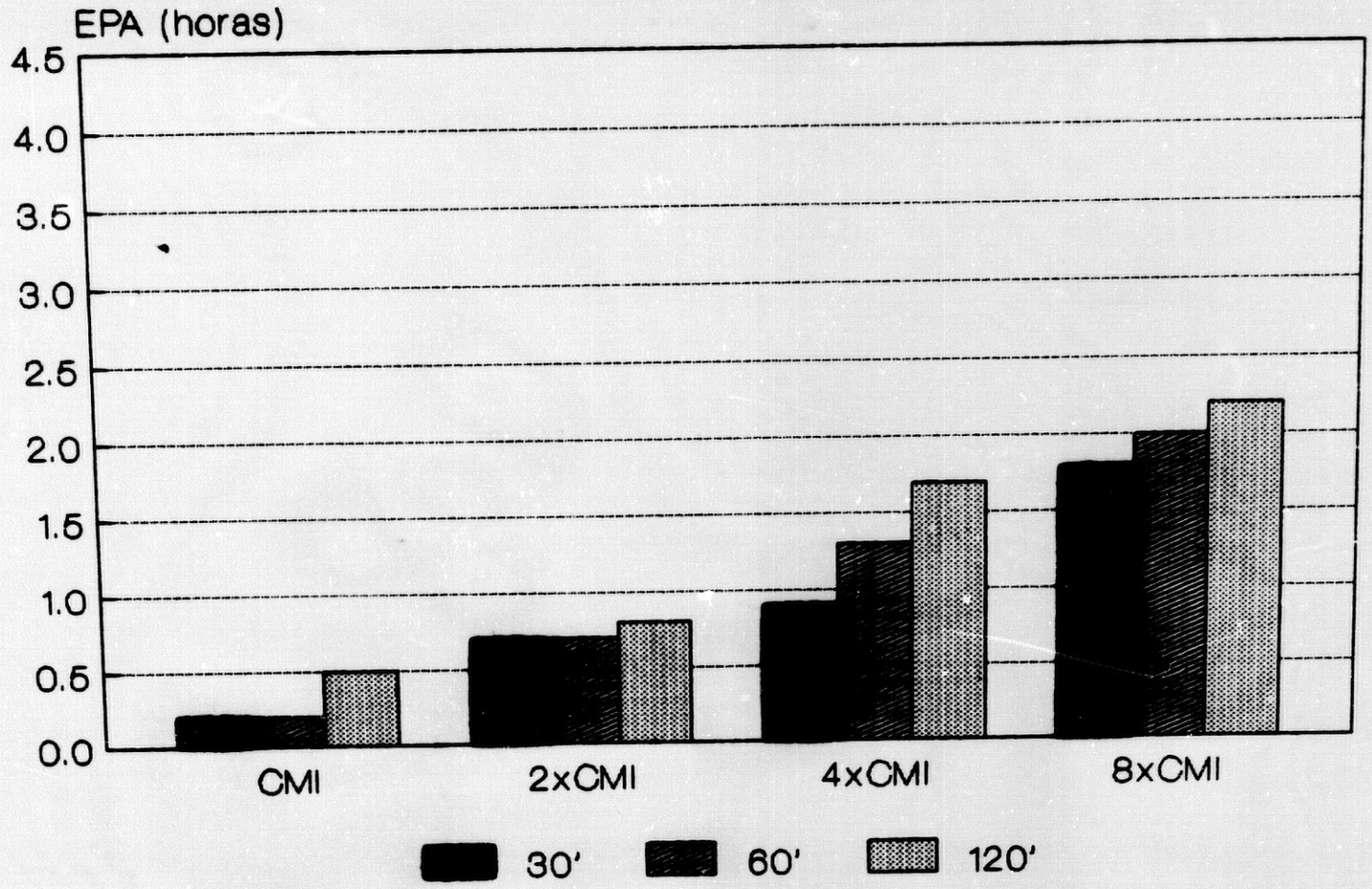
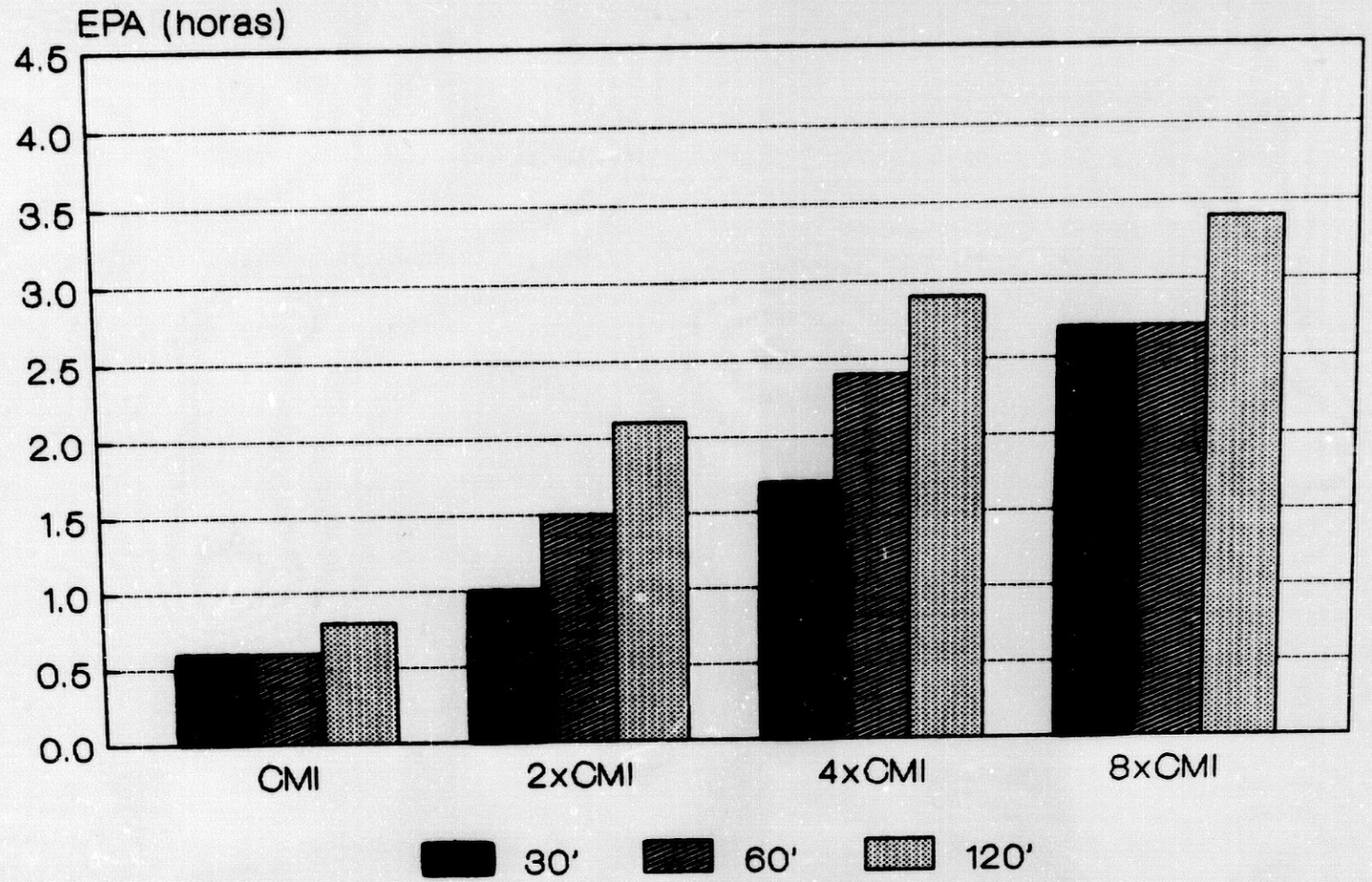


FIGURA 39.- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE EXPOSICION SOBRE EL EPA DE CIPROFLOXACINO FRENTE A *K. pneumoniae* HC-776



ESCHERICHIA COLI.

A. nalidíxico induce un pobre EPA sobre E. coli que supera escasamente la media hora (0.6±0.1 h.) en las condiciones de nuestro estudio. Norfloxacino y ciprofloxacino, por el contrario, fueron capaces de retrasar el crecimiento de E. coli más de una hora (1.5±0.4 h. y 1.4±0.1 respectivamente) existiendo significación estadíastica de éstos frente al primero ($p<0.05$) (tabla 25 y fig. 40-43).

Destaca el EPA de 2.2 h de norfloxacino frente a la cepa E. coli HC- 5, superior en casi una hora al inducido por ciprofloxacino (Fig. 40).

Al estudiar la influencia del tiempo de exposición y concentración sobre el EPA encontramos que ésta es escasa sobre el efecto de a. nalidíxico y norfloxacino e intensa sobre el de ciprofloxacino, sobre el cual no se detecta la tendencia a estabilizarse en un valor máximo de EPA, hecho que si se aprecia en a. nalidíxico (aproximadamente en 0.6 h) y norfloxacino (entre 2 y 3 horas de duración) (Fig. 44-46).

TABLA 25.- EFECTO POSTANTIBIOTICO (EPA) DE AC. NALIDIXICO, NORFLOXACINO Y CIPROFLOXACINO FRENTE A Escherichia coli EXPUESTAS A 4 VECES LA CMI.

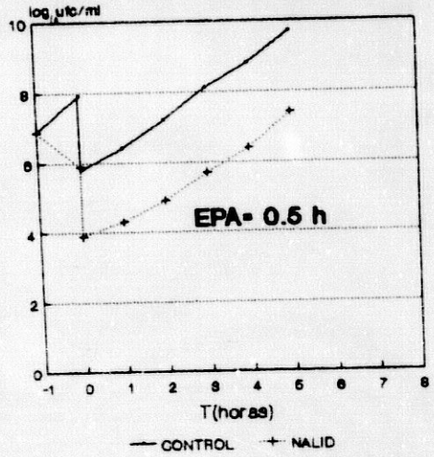
	ANTIMICROBIANO		
Cepa	Ac. Nalid.	Norfloxac.	Ciprofloxac.
HC - 5	0.5	2.2	1.5
HC - 9	0.7	1.0	1.2
HC - 11	0.5	1.5	1.4
HC - 14	0.7	1.2	1.3
M±DS	0.6±0.1	1.5±0.4a	1.4±0.1a

Los resultados se expresan en horas, como la media aritmética ± la desviación estándar de las cuatro cepas.

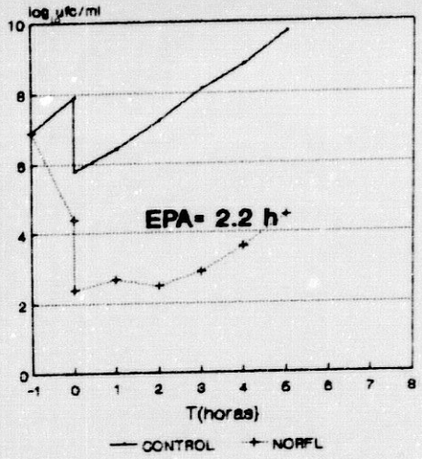
a: significación estadística frente a a. nalidíxico.

FIGURA 40.- EFECTO POSTANTIBIOTICO DE 4 VECES LA CMI DE TRES QUINOLONAS FRENTE A *E. coli* HC-6.

NALIDIXICO



NORFLOXACINO



CIPROFLOXACINO

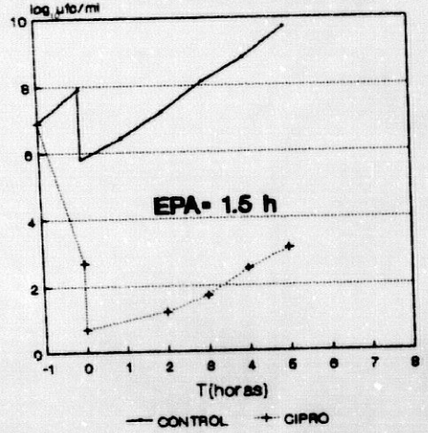
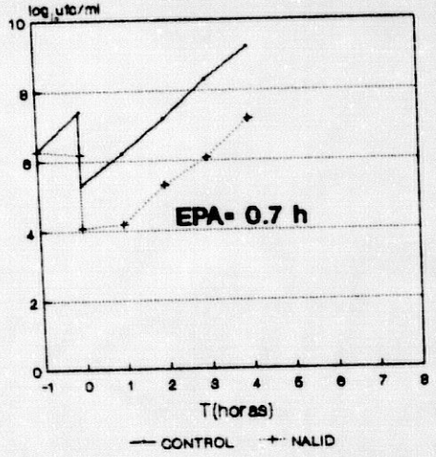
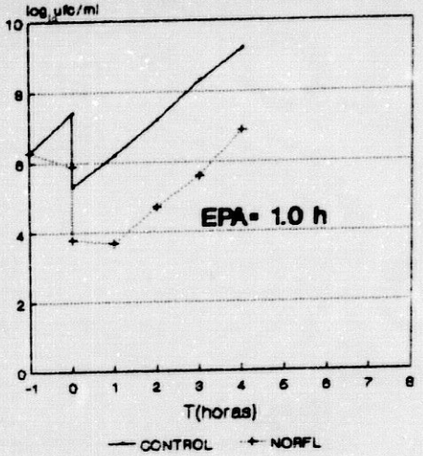


FIGURA 41.- EFECTO POSTANTIBIOTICO DE 4 VECES LA CMI DE TRES QUINOLONAS FRENTE A *E. coli* HC-8.

NALIDIXICO



NORFLOXACINO



CIPROFLOXACINO

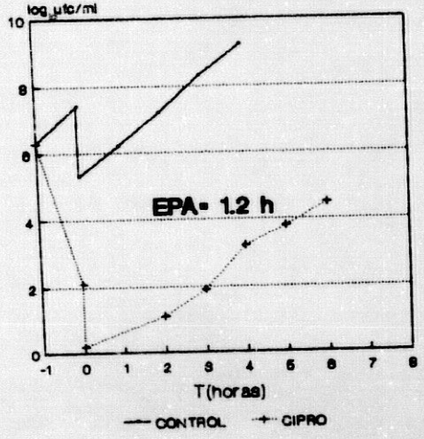
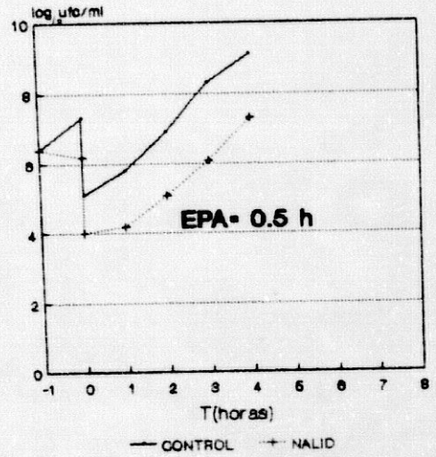
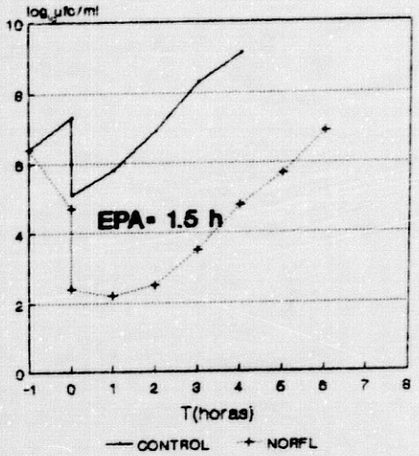


FIGURA 42.- EFECTO POSTANTIBIOTICO DE 4 VECES LA CMI DE TRES QUINOLONAS FRENTE A *E. coli* HC-11.

NALIDIXICO



NORFLOXACINO



CIPROFLOXACINO

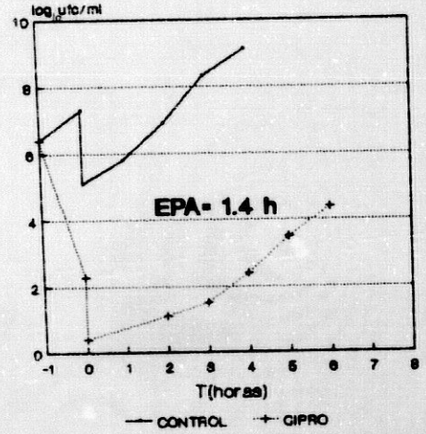
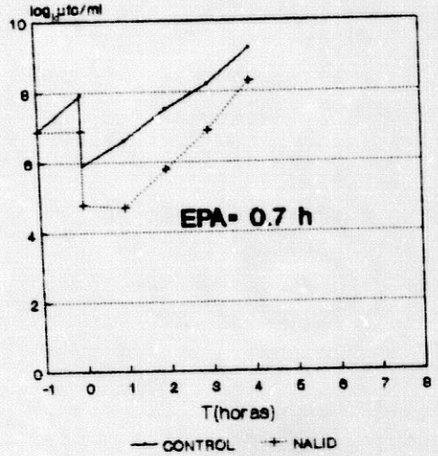
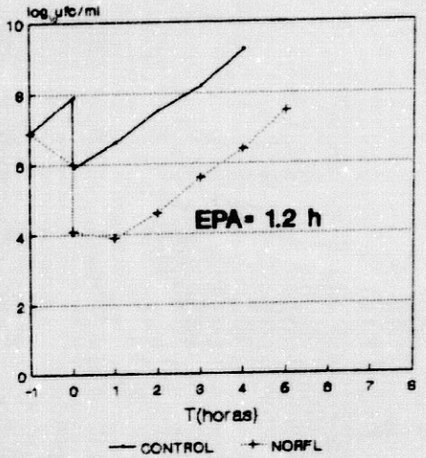


FIGURA 43.- EFECTO POSTANTIBIOTICO DE 4 VECES LA CMI DE TRES QUINOLONAS FRENTE A *E. coli* HC-14.

NALIDIXICO



NORFLOXACINO



CIPROFLOXACINO

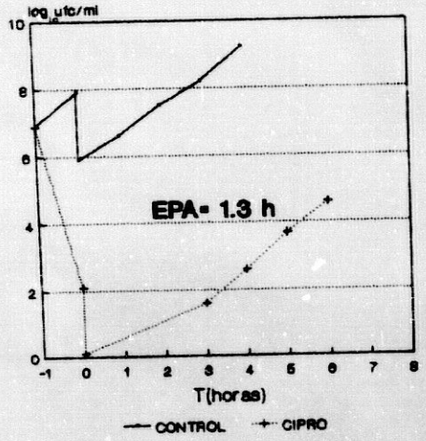


FIGURA 44.- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE EXPOSICION SOBRE EL EPA DE NALIDIXICO FRENTE A *E. coli* HC-5

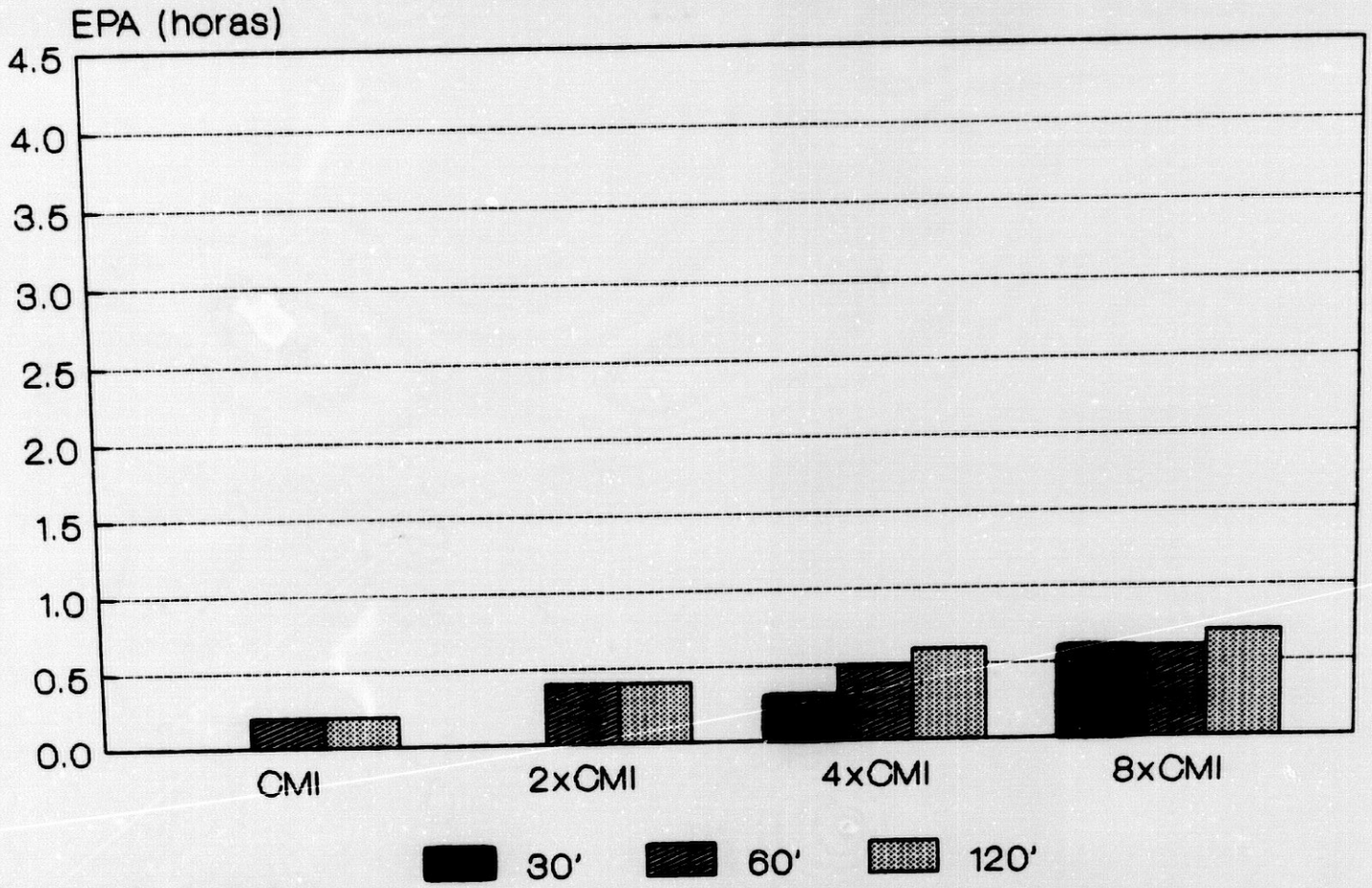


FIGURA 46.- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE EXPOSICION SOBRE EL EPA DE NORFLOXACINO FRENTE A *E. coli* HC-5

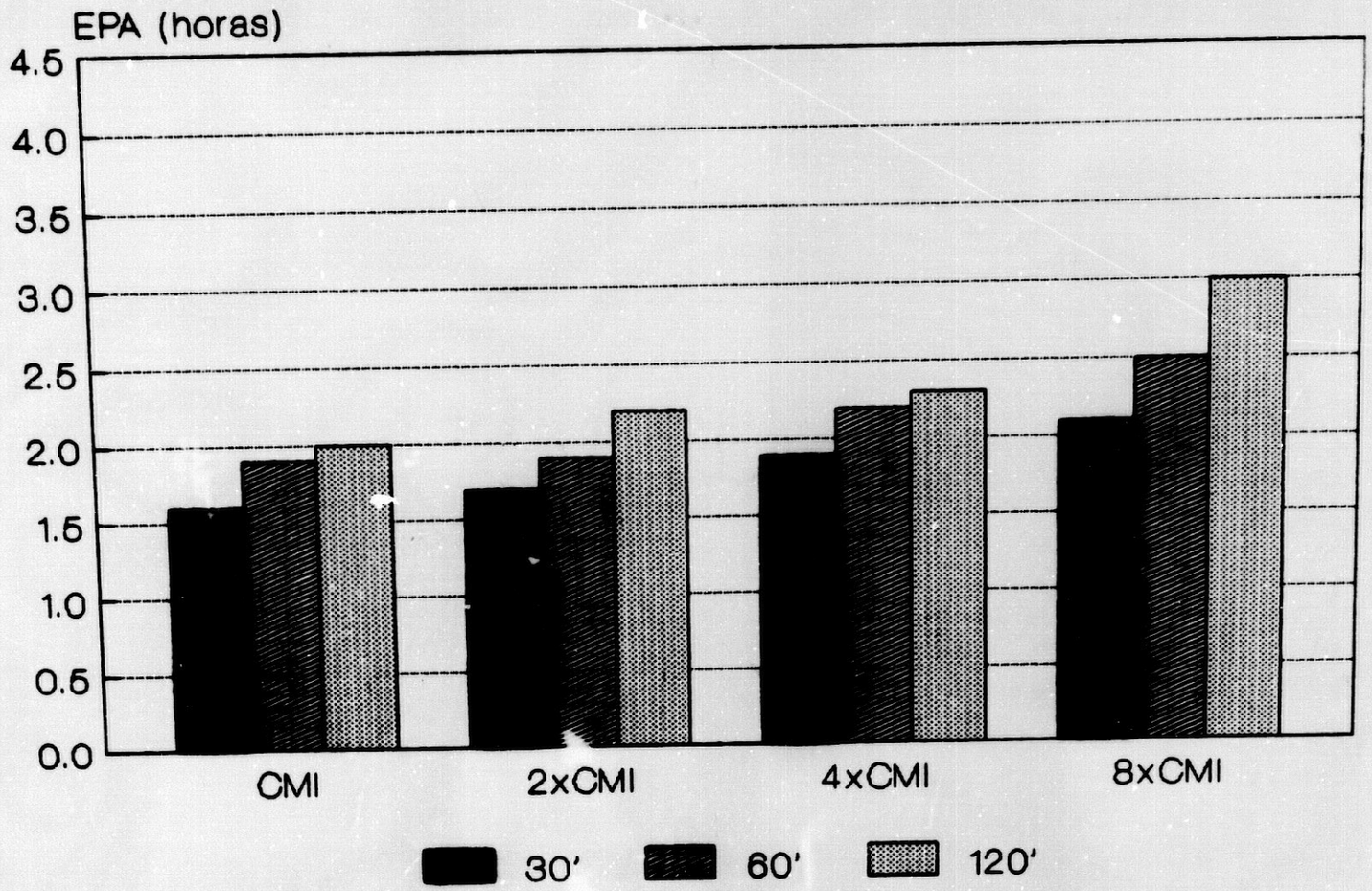
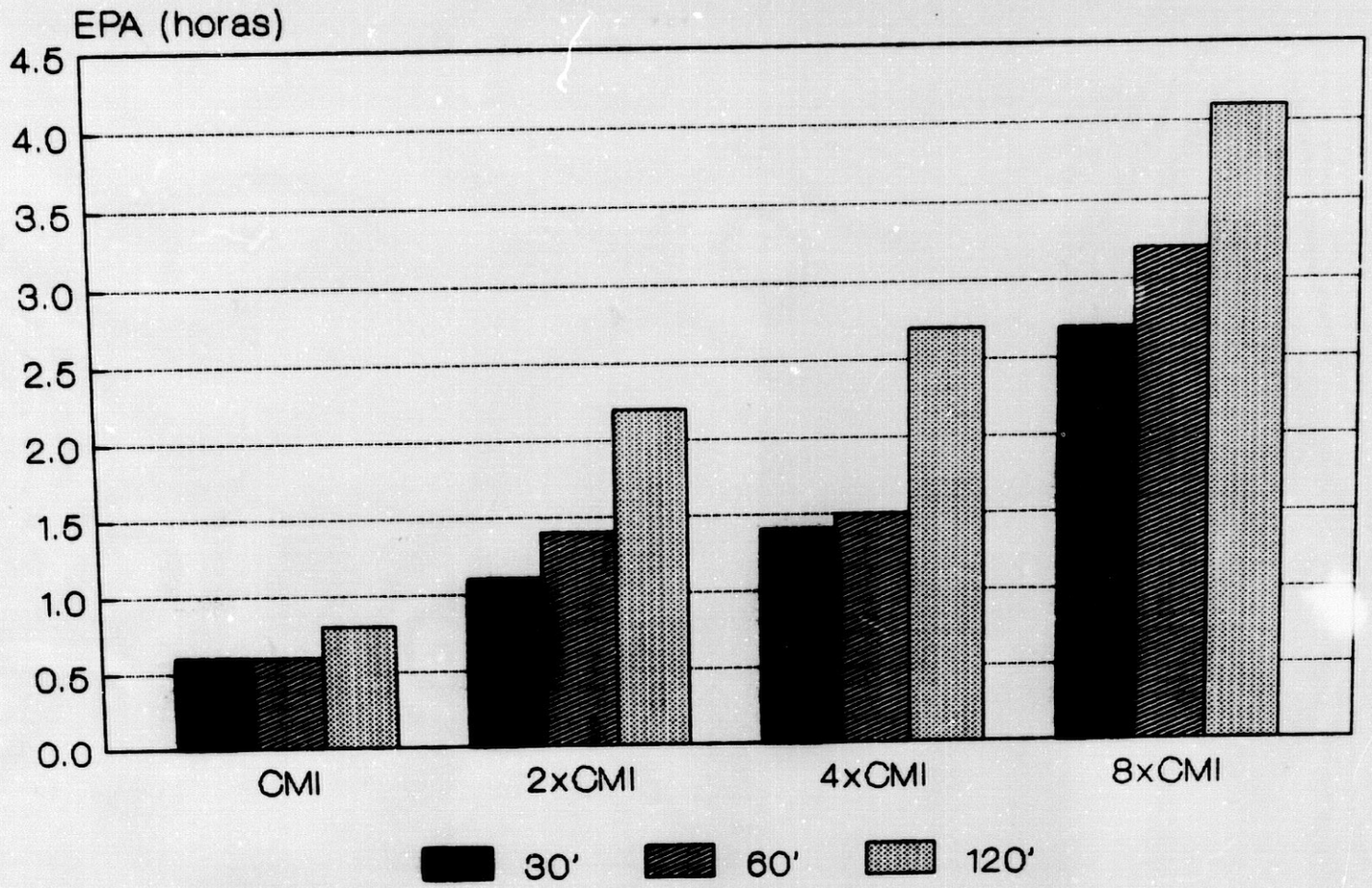


FIGURA 46.- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE EXPOSICION SOBRE EL EPA DE CIPROFLOXACINO FRENTE A *E. coli* HC-5



PSEUDOMONAS AERUGINOSA.

Las cepas de P. aeruginosa se estudiaron sólo frente a norfloxacino y ciprofloxacino debido a la gran resistencia que presentaron a a. nalidíxico (Fig. 47-50).

Las dos quinolonas fluoradas inducen un EPA de 2.4±0.7 h. y 2.9±0.6 h. respectivamente, no existiendo diferencias significativas entre ambos (tabla 26).

La influencia del tiempo de exposición y concentración se estudió sobre la cepa P. aeruginosa HC- 46, observandose que al incrermentarse estos factores se prolonga la duración del efecto. Con estos dos fármacos se aprecia una tendencia a la estabilización en valores de EPA entre 2 y 2.5 horas, hecho que se observa tras el aumento de la exposición a una hora y la concentración a 4 y 8 veces la mínima inhibitoria (Fig. 51-52).

FIGURA 47.- EFECTO POSTANTIBIOTICO DE 4 VECES LA CMI DE DOS QUINOLONAS FRENTE A *P. aeruginosa* HC-40.

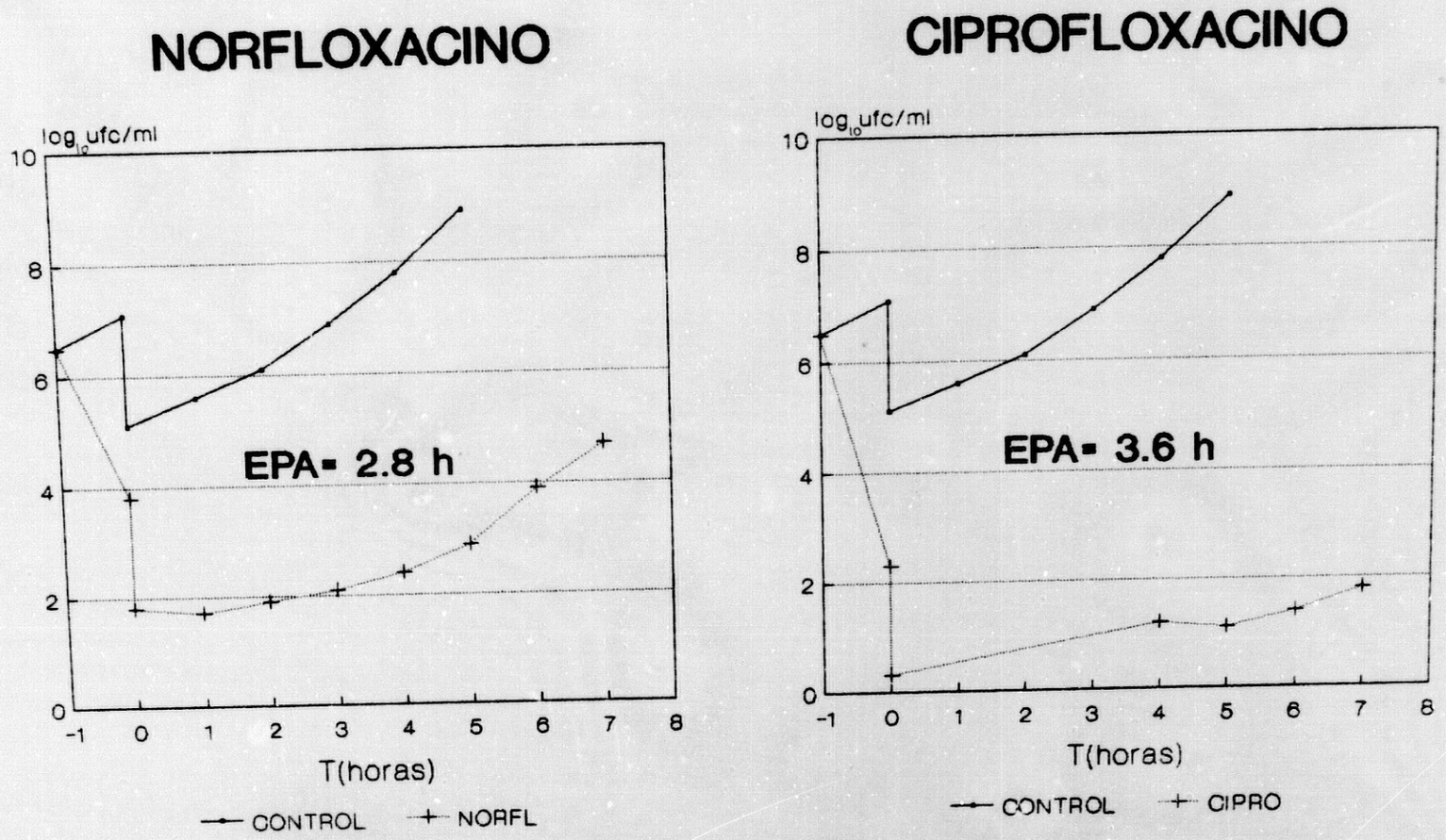
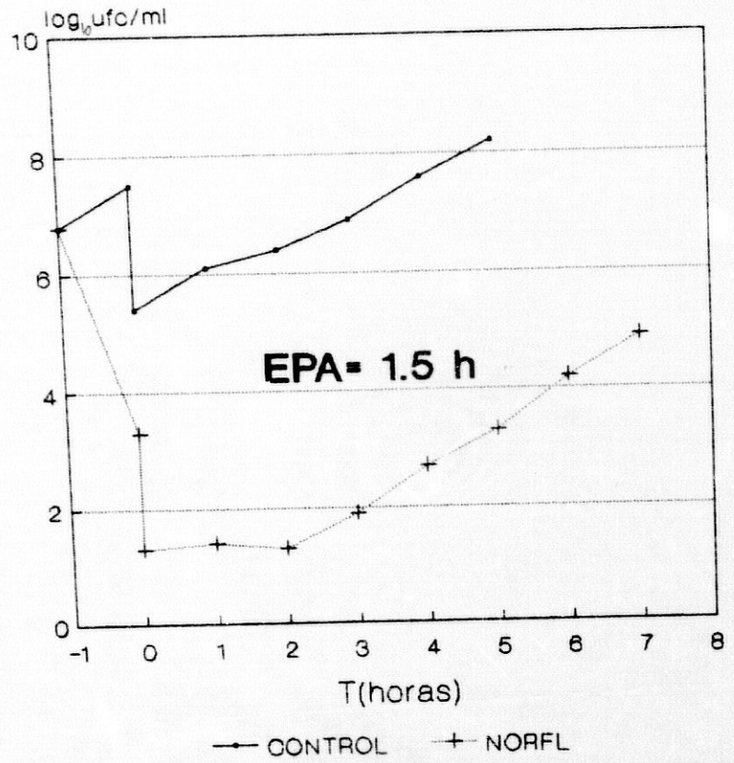


FIGURA 46.- EFECTO POSTANTIBIOTICO DE 4 VECES LA CMI DE DOS QUINOLONAS FRENTE A *P. aeruginosa* HC-46.

NORFLOXACINONO



CIPROFLOXACINONO

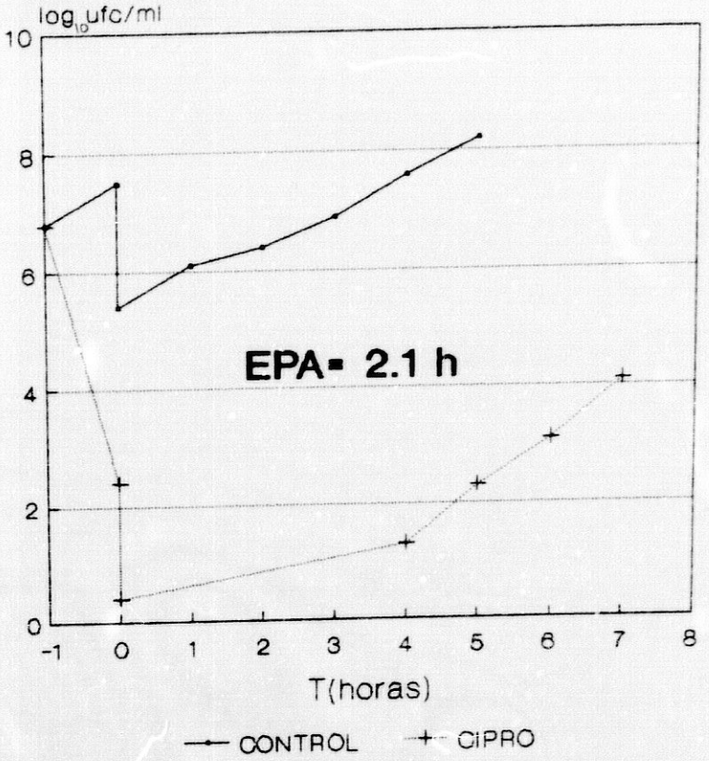


FIGURA 49.- EFECTO POSTANTIBIOTICO DE 4 VECES LA CMI DE DOS QUINOLONAS FRENTE A *P. aeruginosa* HC-58.

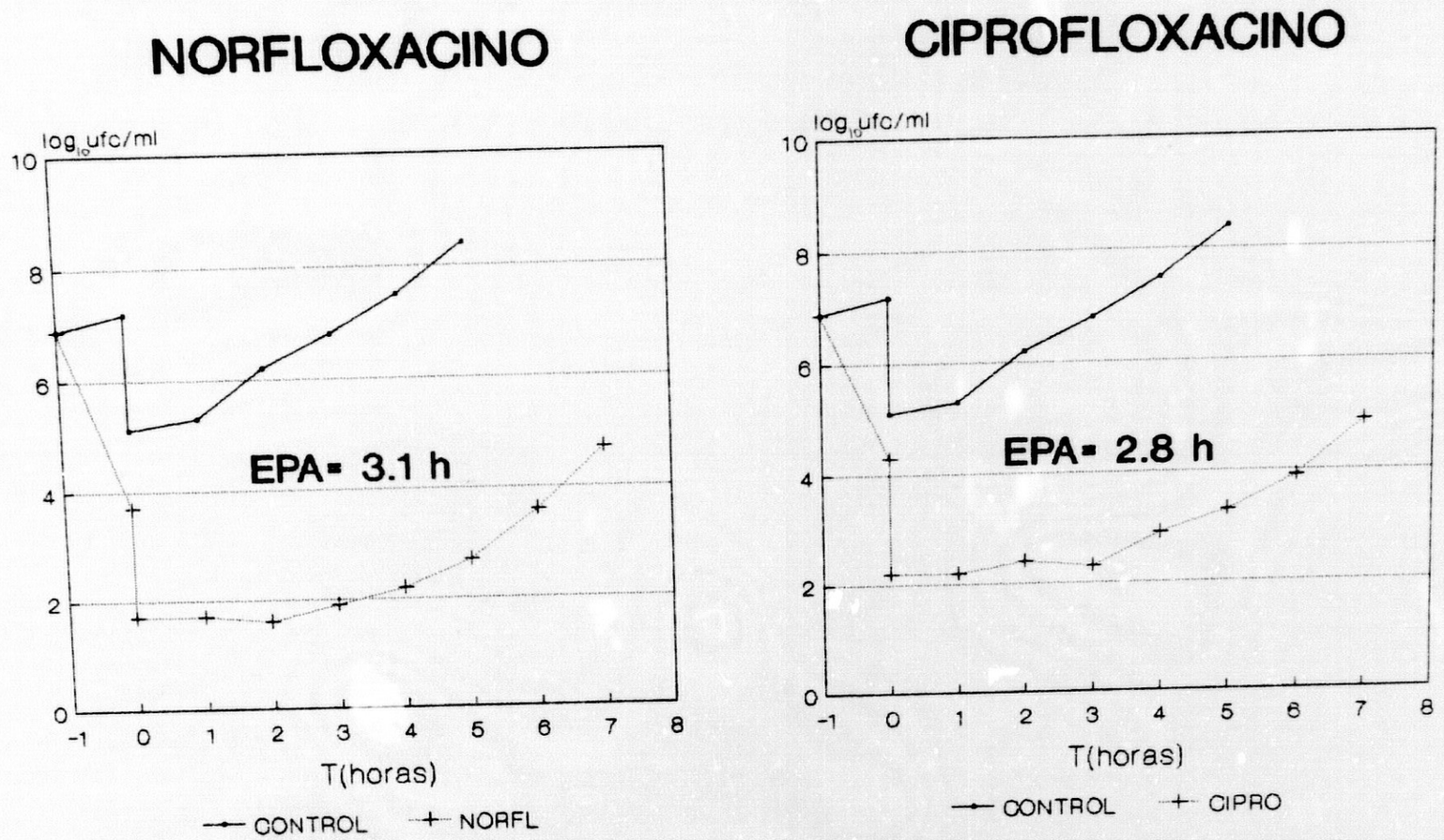


FIGURA 50.- EFECTO POSTANTIBIOTICO DE 4 VECES LA CMI DE DOS QUINOLONAS FRENTE A *P. aeruginosa* HC-60.

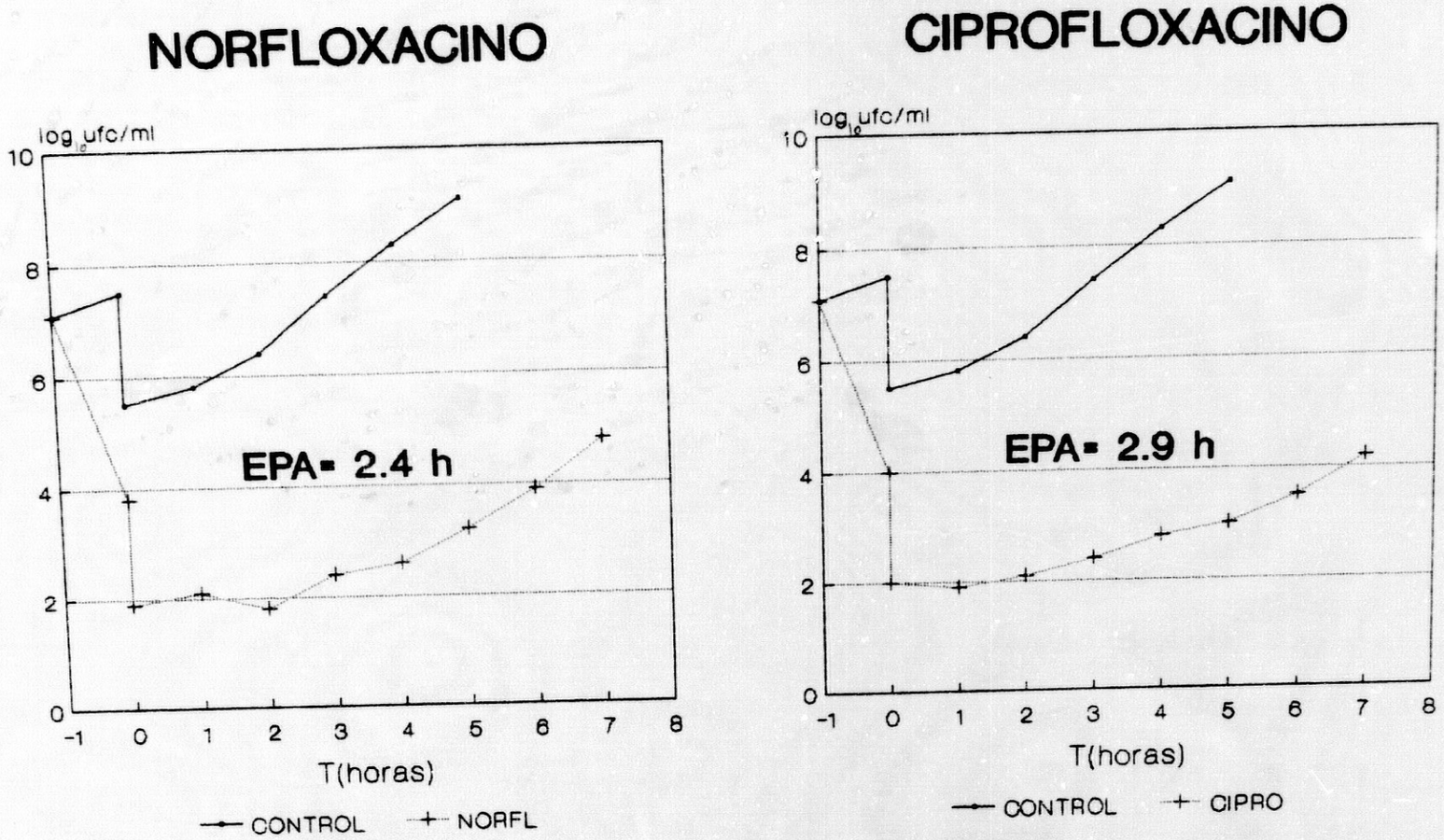


TABLA 26.- EFECTO POSTANTIBIOTICO (EPA) DE NORFLOXACINO Y CIPROFLOXACINO FRENTE A Pseudomonas aeruginosa EXPUESTAS A 4 VECES LA CMI.

	ANTIMICROBIANO	
Cepa	Norfloxac.	Ciprofloxac.
HC - 40	2.8	3.7
HC - 46	1.5	2.1
HC - 58	3.1	2.8
HC - 60	2.4	2.9
M±DE	2.4±0.7	2.9±0.6

Los resultados se expresan en horas, como la media aritmética ± la desviación estándar de las cuatro cepas.

FIGURA 51.- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE EXPOSICION SOBRE EL EPA DE NORFLOXACINO FRENTE A *P. aeruginosa* HC-46

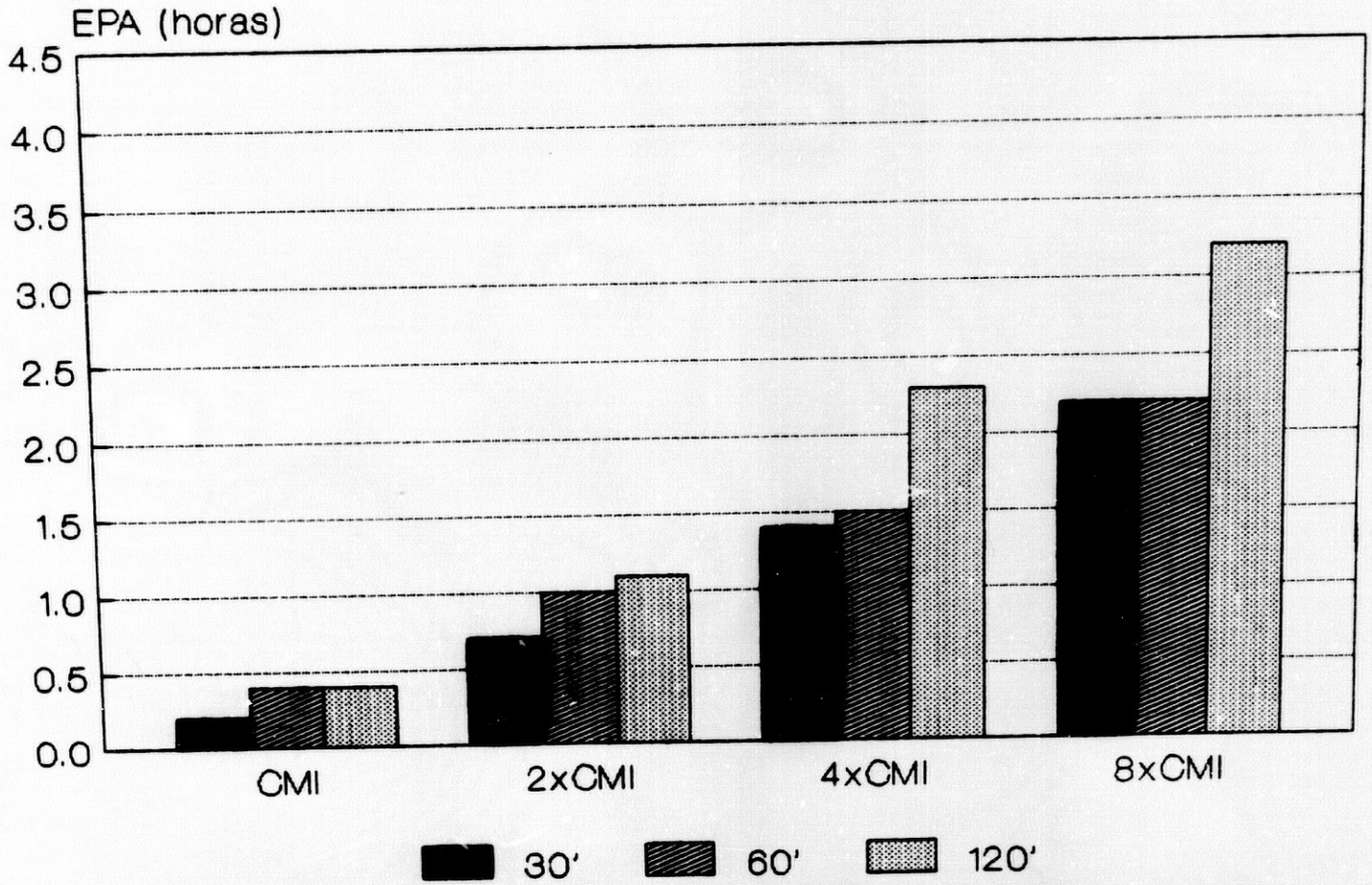
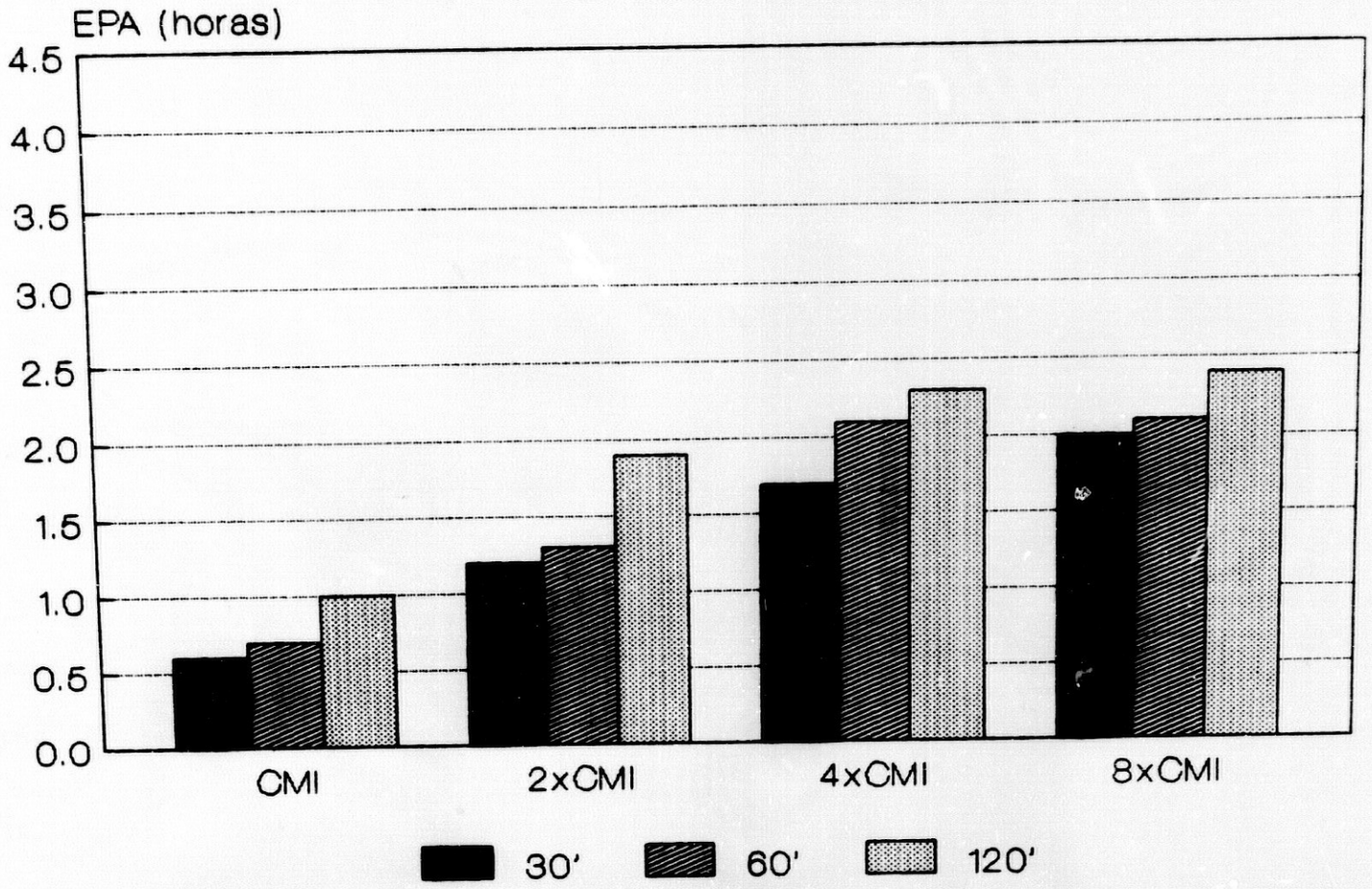


FIGURA 52.- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE EXPOSICION SOBRE EL EPA DE CIPROFLOXACINO FRENTE A *P. aeruginosa* HC-46



3.3.5.- ESTUDIO DEL EFECTO POSTANTIBIOTICO DE A. NALIDIXICO, NORFLOXACINO Y CIPROFLOXACINO EN ORINA.

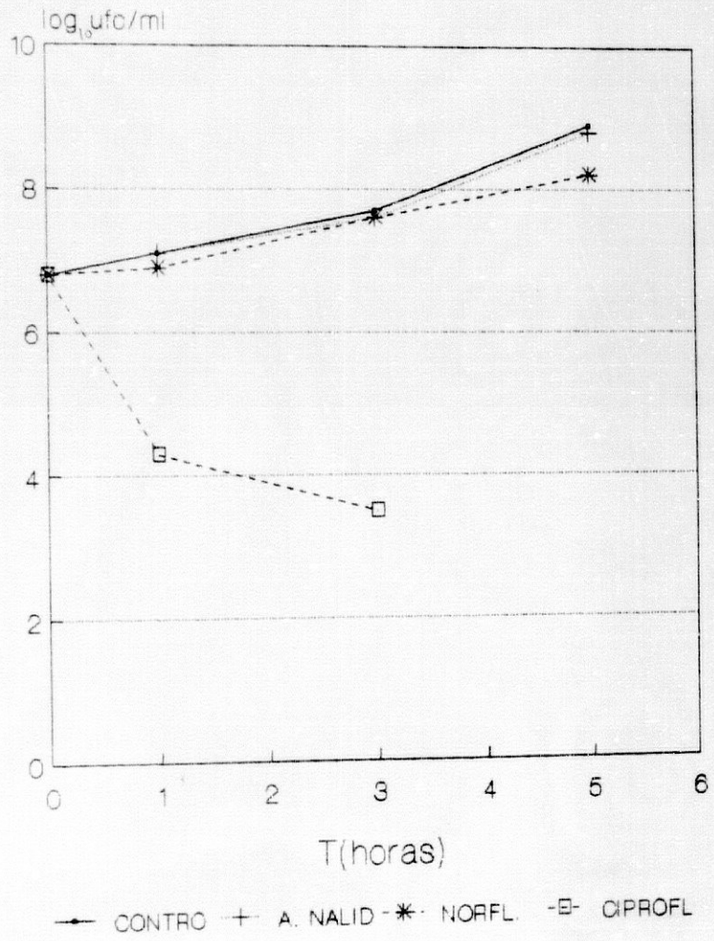
Para el estudio del EPA en orina se utilizaron las mismas cepas seleccionadas para los estudios anteriores.

Como fase previa en la determinación del EPA en orina, teniendo en cuenta que las concentraciones a ensayar eran mucho más elevadas a las probadas anteriormente (concentración urinaria aproximada 300 mcg/ml), ensayamos distintos formas de eliminar el antimicrobiano.

Los primeros ensayos se hicieron eliminando el fármaco por simple dilución 1:1000. La dilución menor (1:100) fué obviada ya que la concentración de antimicrobiano residual era superior a la CMI.

La figura 53 muestra la curva de crecimiento de E. coli HC- 5 expuesta a la dilución 1:1000 de las concentraciones urinarias de fármaco, es decir, 0.3 mcg/ml de a. nalidíxico, norfloxacino y ciprofloxacino. Se aprecia claramente la existencia de una concentración residual de fármaco, fundamentalmente ciprofloxacino, que sigue ejerciendo su actividad letal.

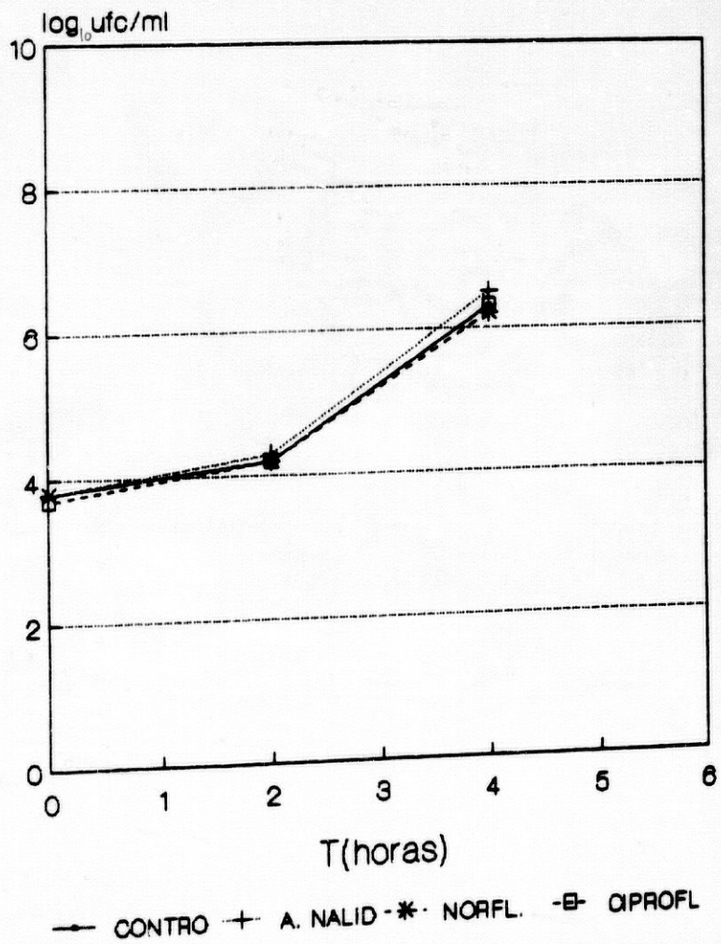
FIGURA 53.- CURVAS DE CRECIMIENTO DE E. coli HC-5 EXPUESTA A 1:1000 LA CONCENTRACION URINARIA DE TRES QUINOLONAS.



Seguidamente se ensayó un sistema mixto para la eliminación del fármaco que consistía en una centrifugación durante 10 minutos a 2500 rpm, decantado de sobrenadante y resuspensión del sedimento en medio de cultivo precalentado (orina estéril), seguida de una dilución 1:1000 en orina precalentada.

La figura 54 muestra las curvas de crecimiento de E. coli HC- 5 tras la exposición e instantánea eliminación de los antimicrobianos por el método anteriormente descrito, observandose un comportamiento similar de los controles de antimicrobiano y el control sin antimicrobiano.

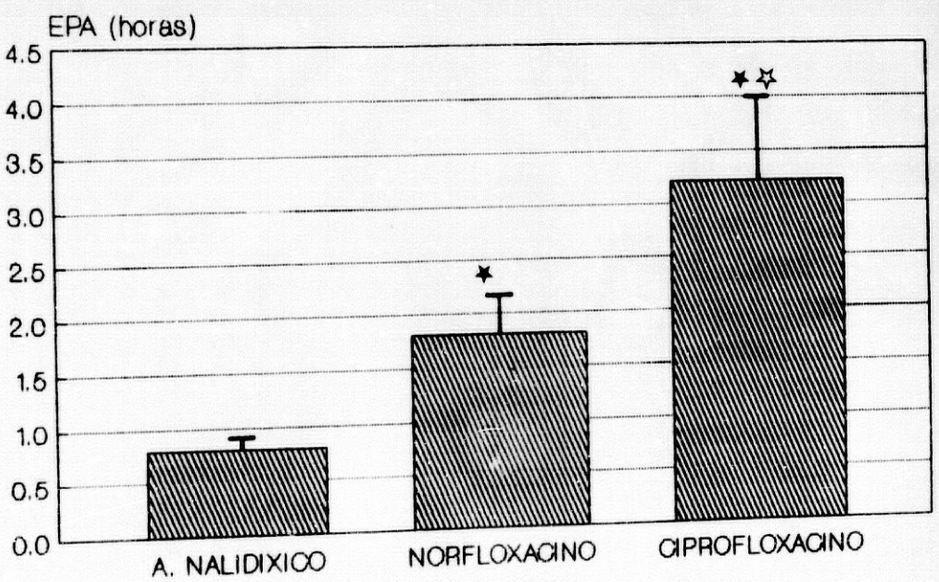
FIGURA 54.- CURVAS DE CRECIMIENTO DE E.coli HC-5 TRAS ELIMINACION POR LAVADO-DILUCION DE TRES QUINOLONAS.



KLEBSIELLA PNEUMONIAE.

En la figura 55 mostramos el EPA de concentraciones urinarias de las tres quinolonas utilizando como medio de cultivo orina estéril a pH 7.2. A. nalidíxico ejerció un efecto cercano a la hora de duración (0.8±0.1 h.); norfloxacino indujo un efecto prácticamente de doble duración al anterior, 1.8±0.4 ($p<0.05$). Ciprofloxacino a su vez, casi duplica la duración del EPA de norfloxacino (3.2±0.8 h.), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$).

FIGURA 55.- EFECTO POSTANTIBIOTICO DE TRES QUINOLONAS SOBRE *CEPAS* DE *Klebsiella pneumoniae*.

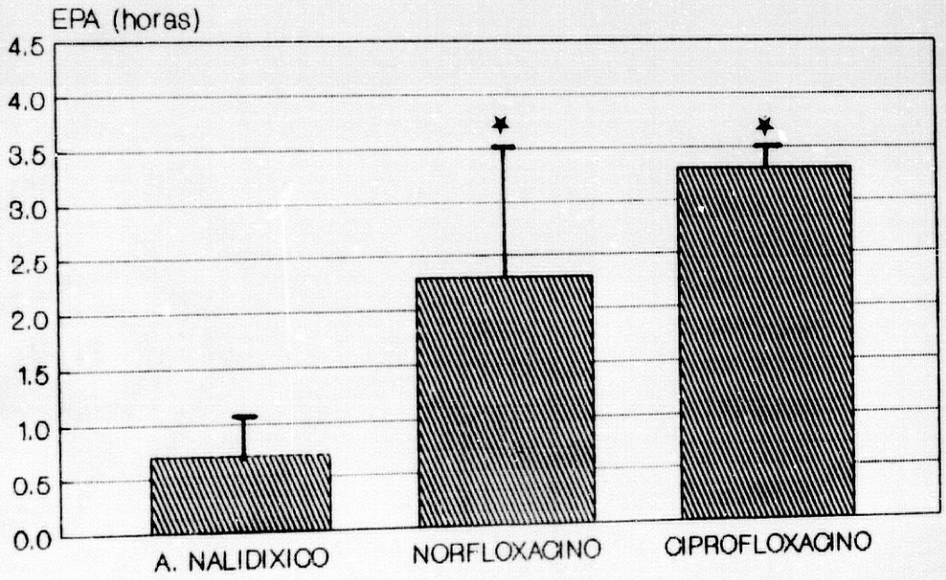


Los resultados se muestran como m±sd.
★ : sign. estadis. frente a nalidixico. ($p < 0.05$)
☆ : " " " " norfloxacino. ($p < 0.05$)

ESCHERICHIA COLI.

E. coli presentó un comportamiento similar al de K. pneumioniae, con ciprfloxacino como fármaco más activo, aunque en éste caso no existieron diferencias significativas entre el EPA de norfloxacino (2.3±1.2 h.) y ciprofloxacino (3.3±0.2 h.). El efecto de a. nalidíxico fué mucho menor al de los anteriores ($p<0.05$), no superando la hora de duración (0.7±0.4 h.) (Fig. 56).

FIGURA 56.- EFECTO POSTANTIBIOTICO DE TRES QUINOLONAS SOBRE *CEPAS* DE *Escherichia coli*

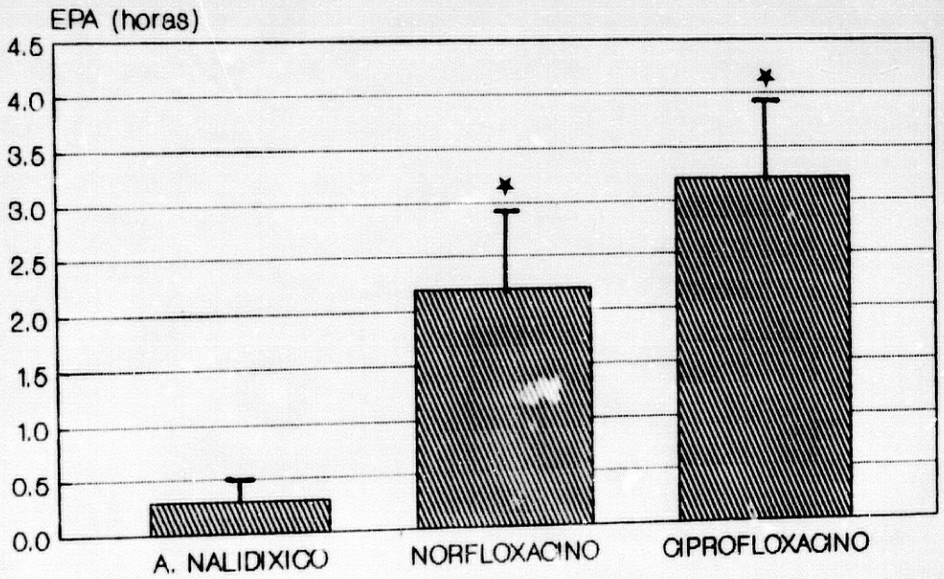


Los resultados se presentan como m±sd.
* significacion estadistica frente a a. nalidixico ($p<0.05$).

PSEUDOMONAS AERUGINOSA.

A. nalidíxico indujo un EPA inferior a treinta minutos (0.3±0.2 h.) como cabía esperar debido a las CMI's que presentaron estas cepas frente a dicho fármaco (128 mcg/ml y superiores). Norfloxacino y ciprofloxacino indujeron retrasos de crecimiento superiores a 2 horas (2.2±0.7 h.) y 3 horas (3.2±0.7 h.) respectivamente, sin existir diferencia estadística entre ellos (Figura 57).

FIGURA 57.- EFECTO POSTANTIBIOTICO DE TRES QUINOLONAS SOBRE *CEPAS* DE *Pseudomonas aeruginosa*.



Los resultados se muestran como m±sd.
*: significacion estadistica frente a a. nalidixico ($p<0.05$).

3.4.- DISCUSION.

Como fase previa para el estudio de la actividad bactericida en el tiempo y efecto postantibiótico, se determinó la sensibilidad (CMI) de las cepas de S. sonnei, K. pneumoniae, E. coli y P. aeruginosa a las tres quinolonas en estudio.

A. nalidixico, como cabía esperar, fué el fármaco que peor actividad mostró; con CMI's entre 2-4 mcg/ml para S. sonnei, K. pneumoniae y E. coli, rango que coincide prácticamente con el expuesto por otros autores (AUCKENTALER y col 1986; KNOTHE 1984). Por otra parte, todas las cepas de P. aeruginosa necesitaron elevadas concentraciones de a. nalidíxico (128 mcg/ml ó más) para inhibir su crecimiento, hecho quizás relacionado con la procedencia intrahospitalaria de estas cepas, que influye en la selección de cepas resistentes.

Las concentraciones mínimas inhibitorias de norfloxacino presentaron una mayor variación según la especie estudiada, oscilando los rangos entre 0.03-0.06 mcg/ml para inhibir cepas de S. sonnei, 0.03-1 mcg/ml para P.aeruginosa, siendo intermedios en E. coli y K. pneumoniae (0.03-0.12 mcg/ml y 0.03-0.5 mcg/ml, respectivamente), resultados similares a los descritos por otros autores (CHIN y NEU 1984; CORNAGLIA y col 1987).

Ciprofloxacino mostró una gran actividad inhibitoria, con CMI's incluso menores a 0.007 mcg/ml para algunas cepas de S. sonnei. El valor máximo encontrado fué de 0,25 mcg/ml,

concentración necesaria para inhibir varias cepas de P. aeruginosa, siendo estos valores comparables a los obtenidos por SANDERS y col. (1987).

A pesar de que el método estándar para conocer la actividad antimicrobiana in vitro es determinar la CMI, este parámetro presenta ciertas limitaciones frente a otros (VOLGEMAN y CRAIG 1986). Así, tanto CMI como CMB (concentración mínima bactericida) representan un efecto,de inhibición o reducción de la población 99.9%, tras la incubación de 18-24 horas, sin tener en cuenta el comportamiento de los microorganismos durante este amplio periodo de tiempo, por lo que no ofrecen una visión contínua del efecto ejercido por el antimicrobiano. Por otra parte, estos métodos no aprecian efectos de concentraciones menores, las cuales podrían ser en un principio inhibidores o bactericidas, pero que no mantuvieran esta actividad tras 18-24 horas de exposición. Por todo ello, el conocimiento del descenso de la población bacteriana en el tiempo, es un mejor método para la caracterización de la actividad bactericida de los antimicrobianos (VOLGEMAN y CRAIG 1986).

En el presente estudio se determinó la actividad bactericida en el tiempo ensayando diversas concentraciones de fármaco.

Al ensayar concentraciones crecientes de antimicrobiano sobre S. sonnei, encontramos una clara dependencia entre concentración y efecto bactericida (EB), que se manifiesta de

forma más patente en las quinolonas fluoradas. Así, pequeños incrementos de concentración (duplicación) producen aumentos significativos del EB , relación ya descrita en otras quinolonas por MINGUEZ y col. (1989a), y SMITH (1986).

Las cepas de K. pneumoniae, E. coli y P. aeruginosa ofrecen un comportamiento similar. Sobre todas ellas, ciprofloxacino y norfloxacino mostraron un EB marcadamente superior al de a. nalidíxico.

Norfloxacino ejerció un efecto bactericida similar al de ciprofloxacino frente a S. sonnei, por el contrario, existieron mayores diferencias en favor del segundo al utilizar otras cepas, diferencias ya señaladas por ZEILER y col. (1984) y LOPEZ-BREA y col. (1990).

El comportamiento de los tres fármacos frente a las cepas ensayadas se podría calificar como bueno, exceptuando la elevada resistencia de P. aeruginosa al a. nalidíxico. Si tenemos en cuenta que los niveles alcanzables por estos fármacos, fundamentalmente en orina, son elevadísimos (aproximadamente 300 mcg/ml) es fácil imaginar que su actividad "in vivo" es notable. Ciprofloxacino, quinolona con mayor espectro de indicaciones, consigue concentraciones moderadas también en suero (2 mcg/ml) mucho mayores a las concentraciones mínimas inhibitorias frente a la mayoría de los microorganismos, hecho que apoya su muy buena actividad "in vivo".

De otro lado , la elevada actividad frente a enterobacterias y no sobre flora anaerobia intestinal(REEVES 1986; EDLUND y col 1987; LOUIS y col 1985), hecho que no ocurre con otros fármacos que causan serias alteraciones de la ecología intestinal (STEINBAKK y col 1986), es una gran ventaja de las quinolonas en el tratamiento de procesos intestinales. Un hecho fundamental que explica la elevada actividad in vivo de las quinolonas, es la elevada proporción de fármaco que se concentra en bilis y heces, hasta 600 mcg/Kg de heces según el antimicrobiano (CAFSKY y col 1984; NEWSOM y col 1985).

VOLGEMAN y CRAIG (1986) sugirieron, tras estudiar varios antimicrobianos por los métodos de CMI, CMB y EB, la clasificación de los antimicrobianos en tres categorías según:

1) Marcada dependencia entre actividad bactericida y concentración.
2) Escasa dependencia entre actividad bactericida y concentración.
3) Bacteriostáticos.

Las quinolonas , según nuestros resultados , quedarían encasilladas en el grupo "1" junto a otros fármacos que actúan sobre la síntesis proteica, como aminoglucósidos.

Hasta el momento, son escasos los estudios existentes sobre el efecto postantibiótico de los inhibidores de la girasa, siendo ciprofloxacino el único estudiado por más de un autor

(FUUSTERD 1987b, c; 1988; CHIN y NEU 1987) y prácticamente nula la información sobre el EPA de norfloxacino (RENNEBERG y WALDER 1989), a. nalidíxico y demás quinolonas (MINGUEZ y col 1989a MOLINARY y col 1989).

En nuestro estudio, los tres fármacos produjeron EPA, dependiente de concentración y tiempo de exposición, sobre S. sonnei. Resalta claramente el menor efecto de a. nalidíxico, que a pesar de alcanzar valores cercanos a las dos horas de duración, en las condiciones de máxima exposición y concentración, es significativamente menor al de las quinolonas fluoradas, existiendo pués una clara relación entre la menor actividad de a. nalidíxico y su EPA.

Los EPA's de norfloxacino y ciprofloxacino superan las dos horas de duración, al aumentar la concentración a 8 veces la CMI y tras una hora de exposición. Destaca el mayor efecto conseguido tras la exposición a norfloxacino comparado con ciprofloxacino, hecho que sucede en nuestra serie sólo en el caso de S. sonnei, no estando unido en este caso la mayor sensibilidad a ciprofloxacino a su menor EPA. No obstante, el EPA de ciprofloxacino está más íntimamente relacionado con la concentración, incrementandose de forma significativa, al aumentar ésta, durante un rango más amplio de concentraciones que en el caso de norfloxacino.

Esto sugeriría que a concentraciones superiores, ciprofloxacino aumentaría su efecto, llegando incluso a superar

el de norfloxacino, suposición que concuerda con la desaparición de diferencias estadísticas entre los efectos de estos dos fármacos demostrada en nuestro estudio, tras la exposición a la mayor concentración ensayada. Frente a las cepas de K. pneumoniae, E. coli y P. aeruginosa, las tres quinolonas son capaces de inducir EPA, exceptuando a. nalidíxico con P. aeruginosa, como cabía esperar debido a la elevada resistencia de nuestras cepas.

De forma global, se aprecia como el EPA se incrementa al hacerlo la sensibilidad de las cepas, correspondiendo un máximo efecto a ciprofloxacino, agente más activo, y el menor a a. nalidíxico, fármaco frente al que se consiguieron las mayores CMI's en las cepas ensayadas; a pesar de esta tendencia, sólo sobre las cepas de K. pneumoniae, ciprofloxacino produce un efecto significativamente superior al de norfloxacino.

Tras una hora de exposición a cuatro veces la CMI, condiciones de estudio "estándar" utilizadas por la mayoría de los autores (CRAIG y GUDMUNSON 1986; CHIN y NEU 1987), a. nalidíxico ejerce un efecto prácticamente nulo sobre la mayoría de las cepas, inferior a media hora (tiempo indicado por algunos autores para considerar existencia de EPA). Duración que contrasta con los efectos inducidos por norfloxacino y ciprofloxacino, superando este último las tres horas de duración; siendo estos resultados comparables con los descritos por CHIN y NEU (1987) y RENNEBERG y WALDER (1989).

La influencia del tiempo de exposición es escasa al ensayar a. nalidíxico frente a K. pneumoniae y E. coli. De igual forma influye poco el incremento de la concentración, aunque hemos de tener en cuenta el reducido efecto que indujo este fármaco sobre nuestras cepas, significativamente menor al ejercido frente a S. sonnei.

El efecto postantibiótico de norfloxacino y ciprofloxacino, de forma más marcada el segundo, sí que es afectado claramente por los factores tiempo y concentración; según nuestros resultados podría deducirse que ambos factores tienen una influencia similar sobre el EPA, teniendo practicamente igual repercusión la duplicación del tiempo de exposición y la de la concentración de fármaco , hecho que concuerda con los hallazgos descritos por BUNDTZEN y col. (1981), al estudiar el EPA de rifampicina sobre E. coli.

El efecto postantibiótico, frente a K. pneumoniae y P. aeruginosa, parece llegar a una meseta de máxima duración, fundamentalmente en el caso de a. nalidixico, lo que se aprecia al hacerse progresivamente menores los incrementos del efecto, pese al aumento de la concentración y del tiempo de exposición. Frente a E. coli se producen, por el contrario, aumentos notables del EPA cada vez que se incrementan las condiciones del ensayo.

Al analizar, de forma global, el comportamiento de las tres quinolonas sobre las diferentes especies ensayadas, llama la atención el notable efecto que produce a. nalidixico frente a S.

sonnei que llega incluso, según las condiciones del ensayo, a alcanzar una duración superior a la hora y media. Por otra parte, esta es la única especie de las ensayadas, sobre la cual norfloxacino ejerció un efecto superior al de ciprofloxacino, que superó en algunas cepas las tres horas de duración.

Destacan el prolongado EPA de norfloxacino sobre P. aeruginosa además de S. sonnei, superior en prácticamente una hora al observado con E. coli y K. pneumoniae. También se aprecian diferencias, entre las distintas especies, en el EPA de ciprofloxacino, el cual ejerce un efecto superior, casi doble, sobre K. pneumoniae y P. aeruginosa al compararlo con las otras dos especies ensayadas. Estos diferentes comportamientos, según la especie bacteriana, ya habían sido establecidos con otros antimicrobianos por diversos autores (VOLGEMAN y CRAIG 1985; CRAIG y GUDMUNSON 1986).

Pero más aún, no sólo existen notables diferencias entre el EPA de las distintas especies, sino que también las hay según la cepa ensayada de una misma especie. En todo caso, dichas diferencias no son muy acusadas, observaciones que coinciden con las de RENNEBERG y WALDER (1989) al estudiar norfloxacino, y otros autores (FUUSTERD 1987a; RESCOTT y col 1988) con ciprofloxacino. Por tanto, podría establecerse que influye de forma más marcada sobre el EPA, el tipo de microorganismo que la cepa.

En el presente estudio se demuestra que las quinolonas ciprofloxacino, norfloxacino y a. nalidixico son capaces de inducir EPA sobre bacilos gram-negativos, aunque existen marcadas diferencias entre los efectos dependiendo de diversos factores; dependencia ya descrita por diversos autores (CRAIG y GUDMUNSON 1986; CHIN y NEU 1987) en otros agentes antimicrobianos incluido ciprofloxacino.

Un hecho importante a señalar es que estos fármacos son capaces de inducir EPA a concentraciones muy bajas, incluso la mínima inhibitoria. MINGUEZ y col. (1989a) al estudiar ofloxacino frente a E. coli describieron también un EPA cercano a la hora tras exposición a la CMI, hecho que a su vez coincide con las observaciones de CRAIG y GUDMUNSON (1986), sobre los antimicrobianos que inhibían tanto la síntesis de RNA como proteica.

Al igual que otros autores describieron la dependencia entre EPA y concentración hasta un punto de máximo efecto, éste parece observarse también en las quinolonas. Así, nosotros encontramos que a partir de 4-8 CMI no se observan , en general incrementos notables de los efectos, margen que coincide con el señalado por otros autores (CRAIG y GUDMUNSON 1986) para este tipo de fármacos, hecho muy diferente del descrito para β-lactámicos (GERBER y CRAIG 1981; SHIMADA y KATO 1976).

Hemos de tener en cuenta que las quinolonas fluoradas, fundamentalmente ciprofloxacino, presentan dificultad para la

medida del EPA debido a su muy rápida actividad letal, lo cual hace prácticamente imposible llegar a conocer el máximo EPA inducible al incrementar la concentración; similares problemas describieron CRAIG y GUDMUNSON (1986) al estudiar la dependencia concentración-efecto en tobramicina.

La tendencia a un EPA máximo, al incrementar la concentración, también se observa al prolongar el periodo de exposición, aunque no de igual manera sobre las distintas cepas estudiadas. EAGLE y MUSSELMAN (1949) ya describieron igual comportamiento en algunas de las cepas de estafilococos que estudiaron frente a penicilina.

La dependencia del EPA, de forma lineal, con el tiempo de exposición y concentración hasta un máximo efecto, sugeriría un mecanismo saturable, tal y como señalaron CRAIG y GUDMUNSON (1986), es decir, el mecanismo dependería de una interacción fármaco-receptor.

El EPA de a. nalidíxico en orina fué comparable al obtenido utilizando las condiciones estándar del estudio, no superando la hora de duración. Frente a P. aeruginosa, como cabía esperar este fué menor, no llegando a superar la media hora.

Norfloxacino originó efecto postantibiótico significativamente mayor al de a. nalidíxico, comprendido este entre 1.8 ± 0.4 h. inducido sobre K. pneumoniae y 2.2 ± 0.7 h. frente a P.aeruginosa ; efectos de similar duración a los conseguidos en

medio de cultivo a 4 veces la CMI de fármaco (1.5±0.1 h. sobre K. pneumoniae y 2.4±0.6 h. sobre P.aeruginosa).

Ciprofloxacino es el único inhibidor de la girasa del que existe documentación bibliográfica sobre su EPA en orina, con valores entre 0.3 y 6.0 horas (CHIN y NEU 1987). En nuestra serie mostró el mejor comportamiento, detectandose diferencias estadísticas en las tres especies bacterianas frente a a.nalidíxico y en K. pneumoniae frente a norfloxacino.

En los microorganismos estudiados, el EPA de ciprfloxacino superó las tres horas de duración, que en determinadas cepas llegć incluso a 4 horas. Destaca una mayor similitud entre los efectos inducidos sobre las distintas especies, lo que contrasta con los valores tan dispares encontrados por CHIN y NEU (1987), que señalaron un efecto de 6 horas sobre P. aeruginosa y de tan sólo 0.3 sobre K.pneumoniae. Una clara diferencia entre su estudio y el presente es el pH de la orina utilizada, neutro en nuestro caso y 5.5 en el de los primeros; a su vez estos autores exponen el antimicrobiano durante 2 horas.

Un hecho que llama la atención, es el moderado EPA, no superior a 4 horas, que se consigue con concentraciones tan elevadas de fármaco (300 mcg/ml), y que dicho efecto sea similar al que describíamos con concentraciones muchísimo menores (0.028 mcg/ml). La razón, como parece fácil entender, radica en el medio de cultivo utilizado en el estudio, que como señalaron VOLGEMAN y

CRAIG (1985), es uno de los factores que influyen en el EPA. El interés de estudiar el EPA en orina, y no en otro fluído, fué debido a que éste es el medio en el cual desarrollarían su actividad las quinolonas frente a los microorganismos de nuestro estudio, procedentes de individuos con ITU. Como han señalado algunos autores sobre otros antimicrobianos, el EPA está relacionado con el mecanismo bactericida del fármaco (CRAIG y GUDMUNSON 1986); de acuerdo con esto, los factores que influyen sobre éste también afectan al desarrollo del EPA. En nuestro caso es plenamente aceptada la influencia que la concentración de Mg^{++} sobre la actividad bactericida de las quinolonas, la cual puede verse reducida hasta 10 veces, al pasar de 0.2mM a 0.5mM. Por otra parte, RACTLIFFE y SMITH (1984) indican en sus trabajos una reducción de la actividad de estos fármacos en orina. Parece pues justificado el pequeño EPA inducido por concentraciones elevadas de fármaco en orina, que en nuestro caso contenía aproximadamente 8 mM/litro de Mg^{++}.

De acuerdo al EPA inducido sobre bacilos gram-negativos, se pueden diferenciar dos grupos de antimicrobianos, como han señalado MINGUEZ y col. (1989b), en relación directa con su mecanismo de acción. Uno agruparía a los fármacos que producen un corto efecto, que incluso puede ser negativo; en este grupo estarían incluídos los ß-lactámicos, a excepción de imipenem (BUSTAMANCE y col 1984; ODENHOLT y col 1989; BAQUERO y col 1986) que por su diferente lugar de acción produce la lisis bacteriana sin originar formas filamentosas (SPRATT y col 1977), y no induce

el rápido desarrollo bacteriano tras la eliminación del fármaco, responsable del EPA negativo de los demás ß-lactámicos (ODENHOLT y col 1989).

En el segundo grupo de antimicrobianos estarían aquellos capaces de producir de moderados a prolongados efectos, quizá en consonancia también con su mecanismo de acción; ejemplos serían aminoglucósidos, cloramfenicol e inhibidores de la girasa, es decir, fármacos que de una u otra forma afectan a la síntesis proteíca (ISAKSSON y col 1988; MINGUEZ y col 1989b).

Para intentar explicar el origen del efecto postantibiótico, es decir, del mecanismo por el que se produce, se postularon dos teorías (CRAIG y GUDMUNSON 1986). La primera hace referencia a un daño no letal producido por el antimicrobiano, y que tras su retirada permitiría la recuperación de la bacteria y posterior desarrollo, teoría que unificaría el mecanismo de acción del fármaco y el mecanismo por el que se produce el EPA. La segunda teoría señala como causa del EPA, la persistencia del fármaco en su lugar de unión al microorganismo tras la eliminación. Esta hipótesis parece no estar de acuerdo con los hallazgos de GERBER y CRAIG (1981), los cuales tras exponer el microorganismo a eritromicina y eliminarla, y dejando el cultivo en frío un tiempo suficiente para que se produjera la difusión del fármaco fuera del microorganismo desde su lugar de unión (ribosoma), seguían detectando EPA.

Parece por tanto aceptable, que la duración del EPA está íntimamente ligada con el mecanismo de acción, y más si cabe con el tipo de lesión que producen los distintos agentes antimicrobianos sobre la bacteria.

El EPA de las quinolonas pués, estaría relacionado con la unión de estas a la girasa del DNA y a la inhibición de la síntesis proteica consecuente

En nuestros resultados, se observan netas diferencias entre el EPA de a. nalidíxico y las dos quinolonas fluoradas. También existen entre éstas a favor de un mayor efecto de ciprofloxacino, que a su vez parece ser más afectado por los factores tiempo de exposición y concentración. Estas diferencias podrían justificarse de acuerdo a las distintas formas de acción de estas tres quinolonas; así, ciprofloxacino sería superior al de los demás por el doble mecanismo de acción que posee, como se describió en el primer capítulo, que no comparte con a. nalidixico, norfloxacino y otras quinolonas (SMITH y LEWIN 1988). Por otra parte, también existe una tercera acción en norfloxacino y no en otros fármacos, descrito como mecanismo C por RATCLIFFE y SMITH (1985), responsable de la actividad de este fármaco sobre bacterias en fase estacionaria. De acuerdo con estos diferentes mecanismos de acción, dobles en norfloxacino y ciprofloxacino, se podrían justificar los superiores efectos inducidos , en general, por estos fármacos en comparación con a. nalidíxico.

Parece por tanto, que sobre el EPA no sólo influye el tipo o grupo de antimicrobiano, sino que también, dentro de una familia, en nuestro caso quinolonas, pueden existir diferencias apreciables que parecen estar relacionadas, en último término, con el mecanismo íntimo de acción de los diferentes antimicrobianos. Este comportamiento ya fué descrito por ODENHOLT y col. (1989) como responsable del prolongado EPA de imipenem respecto a los demás ß-lactámicos.

El EPA está llamado a ser, como han señalado diversos autores (CHIN y NEU 1987; NIGHTINGALE 1987), un parámetro muy valioso en el establecimiento de los regímenes de dosificación, los cuales serán más racionales al tener en cuenta junto a los caracteres farmacocinéticos del fármaco, el efecto postantibiótico.

Asimismo, parece fácil entender que la farmacocinética, fundamentalmente el tiempo durante el cual el antimicrobiano está en el organismo a concentraciones eficaces (suprainhibitorias), incidirá drásticamente sobre el EPA junto a los niveles máximos alcanzables. De forma que, fármacos con prolongada vida media y capaces de alcanzar concentraciones elevadas en el organismo, inducirán mayor efecto. Por otra parte, la CMI condicionaría el tiempo durante el cual existen concentraciones eficaces de fármaco , hecho que se ha de tener en cuenta al extrapolar el EPA de una cepa a otra con distinta sensibilidad.

Hasta el momento, existe controversia en la relación existente entre el EPA "in vivo" e "in vitro". Por una parte HESSEN y col. (1988; 1989) no encuentran correlación entre ambas condiciones al estudiar gentamicina y penicilina más gentamicina en el tratamiento de endocarditis. Otros autores (VOLGEMAN y col 1988; ODENHOLT y col 1989; GUDMUNSON y col 1986) señalan, salvo escasas excepciones, una clara similitud entre los efectos que determinan "in vivo" e "in vitro" con diversos antimicrobianos.

RENNEBERG y WALDER (1989) al estudiar el EPA de imipenem, amikacina y norfloxacino describen resultados similares al utilizar condiciones "in vivo" e "in vitro", aunque en general algo superiores en estas últimas, con la excepción de imipenen. Hemos de ser cautos al comparar estos resultados con los de otros autores en los que no son superiores los resultados descritos "in vivo" (VOLGEMAN y col 1988; HESSEN y col 1989), ya que éstos utilizan modelos experimentales con animales neutropénicos, en los cuales no existe igual cooperación en la erradicación de la infección, que en los animales con sus defensas intactas utilizados por RENNEBERG y WALDER (1989). Por tanto, el estado inmune del individuo, sería otro factor que se debería tener en cuenta en la valoración clínica del efecto postantibiótico.

Debido a los numerosos factores que condicionan el efecto postantibiótico, tanto "in vivo" como "in vitro", no

parece nada fácil establecer los criterios que valoren el impacto del EPA sobre los regímenes de dosificación de los diferentes antimicrobianos, en tanto no se estudien debidamente todos y cada uno de los factores antes citados, en la relación antibiótico-bacteria-huesped.

3.5.- CONCLUSIONES.

1.- Las quinolonas fluoradas estudiadas muestran una elevada actividad frente a los microorganismos ensayados, claramente superior a la de ácido nalidíxico.

2.- Acido nalidíxico, norfloxacino y ciprofloxacino podrían encuadrarse en el grupo 1 de la clasificación de Volgeman y Craig, por su actividad bactericida muy dependiante de la concentración.

3.- Los inhibidores de la girasa ensayados son capaces de inducir efecto postantibiótico sobre S. sonnei, K. pneumoniae y E. coli; norfloxacino y ciprofloxacino sobre P. aeruginosa, siendo claramente superiores los efectos de estas dos quinolonas frente al ácido nalidíxico.

4.- El efecto postantibiótico de estos fármacos está directamente relacionado con la concentración y tiempo de exposicón.

5.- El efecto postantibiótico de los inhibidores de la girasa en orina, a las concentraciones en que estos se encuentran habitualmente en ella, es menor del que cabía esperar de tan elevadas concentraciones, hecho que se relaciona por el descenso de actividad que estos fármacos tienen en orina, unido a la elevada proporción de Mg ++ que antagoniza el efecto de las quinolonas.

6.- Debido a la rápida actividad bactericida y efecto postantibiótico de estos fármacos sobre los bacilos gram-negativos, hechos no valorados habitualmente en el estableciemiento de los regímenes de dosificación, creemos que sería necesario un replanteamiento de dosis y pautas de administración.

CAPITULO CUARTO. BIBLIOGRAFIA.

ANHALT JP, SABATH LD, BARRY AL: Special tests: bactericidal activity, activity of antimicrobics in combination and detection of B-lactamase production. En: EH Lennette, A Balows, WH Hausler and JP Truant (ed). Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, 3a ed. Washington DC 1980; 478-484.

AUCKENTHALER R , MICHEA-HAMZEHPOUR M , PECHERE JC: In vitro ativity of newer quinolones against aerobic bacteria. J Antimicrob Chemother 1986; 17 (Suppl. B): 29-39.

BALL AP, WALLACE ET: A ten year study of the sensitives of urinary pathogens in a pyelonephritis unit. J Inst Med Res 1974; 2 (Suppl.): 18-22.

BALOWS A, HALL CT, GAVAN TL: Standarization and quality control of disk susceptibility testing in the United States. En: A. Bondi, JT Bartola y JE Prier (ed). The clinical laboratory as an aid in chemotherapy of infectious disease. University Park Press, Baltimore 1977; 19-43.

BAMBERGUER DM, PETERSON LR, GERDING DN, MOODY JA, FASCHING CE:Ciprofloxacin, azlocilin, ceftizoxime and amikacin alone and in combination against gram-negative bacilli in an infected chamber model. Antimicrob Agents Chemother 1987; 18: 51-53.

BARRY AL: The antimicrobic susceptibility test: principles and practices. Lea y Febiger (ed). Filadelfia 1976.

BAQUERO F, CULEBRAS E, PATRON C, PEREZ-DIAZ JC, MEDRANO JC, VICENTE MF: Post-antibiotic effect of imipenem on gram positive and gram negative microorganisms. J Antimicrob Chemother 1986; 18 (Suppl E): 47-59.

BARLOW AM: Nalidixic acid infections of the urinary tract; Laboratory and clinical investigations. Brit Med J 1963; 2: 1308-1310.

BEDARD J, WONG S, BRYAN LE: Accumulation of enoxacin by Escherichia coli and Bacillus subtilis. Antimicrob Agents Chemother 1987; 31: 1348-1354.

BEGGS WH, JENNE JW: Isoniazid uptake and growth inhibition of Mycobacterium tuberculosis in relation to time and concentration of pulsed drug exposures. Tubercle 1969; 50: 377-85.

BERGAN T, CARLSEN IB: Bacterial kill rates of amoxycillin and ampicillin at exponentially diminishing concentrations simulating in vivo conditions. Infection 1980; 8(Suppl): 103-108.

BIGGER JW: The bactericidal action of penicillin on Staphylococcus pyogenes. Ir J Med Sci 1944; 227: 533-68.

BINFORD JS, BINFORD LF, ADLER P: A semiautomated microcalorimetric method of antibiotic sensitivity testing. Am J Clin Pathol 1973; 59: 86-94.

BRENNER DJ: Family Enterobacteriaceae. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Sneal PHA. NS Mair, ME Sharpe, JG Holt (ed). 1a ed. Williams & Wilkins. Baltimore 1984: 408-516.

BLASSER J, STONE BB, ZINNER SH: Efficacy of intermittent versus continuous administration of netilmicin in a two compartment in vitro model. Antimicrob Agents Chemother 1985; 27: 343-349.

BUCHBINDER LG, WEBB JC, ANDERSON L, MC CABE WR: Laboratory studies and clinical pharmacology of nalidixic acid. Antimicrob Agents Chemother 1963; 308-312.

BUNDTZEN RW, GERBER AU, COHN DL, CRAIG WA: Post-antibiotic suppresion of bacterial growth. Rev Infect Dis 1981; 3: 28-37.

BUSTAMANCE CI, DRUSANO CL, TATEM BA, STANDIFORD HC: Postantibiotic effect of imipenem on Pesudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 1984; 26: 678-682.

BURMAN LG: R-plasmid tranfer and its response to nalidixic acid. J Bacteriol 1977; 131: 76-81.

BURMAN LG: Apparent absence of transferable resistence to nalidixic acid in phathogenis gram negative bacteria. J Antimicrob Chemother 1977; 3: 509-512.

CAFSKY RD, DU BOUCHET L, LANDESMAN SH: Recovery of

norfloxacin in feces after administration of single oral dose to human volunteers. Antimicrob Agents Chemoter 1984; 26: 110-111.

CHAO L: An unusual interaction between the target of nalidixic acid and novobiocin. Nature 1978; 271: 385-386.

CHENG AF, LI MKW, LING TKW, FRENCH GL: Emergence of ofloxacin-resistent Citrobacter freundii and Pseudomonas maltophilia after ofloxacin therapy. J Antimicrob Chemother 1987; 20: 283-292.

CHIN NX, BRITTAIN DC, NEU HC: In vitro activity of Ro 23-6240, a new fluorinated 4-quinolone. Antimicrob Agents Chemother 1986; 29: 675-680.

CHIN NX, NEU HC: Ciprofloxacin, a quinolone carboxylic acid compound active against aerobic and anaerobic bacteria. Antimicrob Agents Chemother 1984; 25: 319-326.

CHIN NX, NEU HC: Post-antibiotic suppresive effect of Ciprofloxacin against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Am J Med 1987; 82 (Suppl. 4A): 58-62.

CORNAGLIA G, POMPEI R, DAINELLI B, SATTA G: In vitro activity of ciprofloxacin against aerobic bacterial isolated in a Southern European hospital. Antimicrob Agents Chemother 1987; 31: 1651-1655.

CRAIG WA, GUDMUNSON S: The post antibiotic effect.

En: Lorian V (ed). Antibiotics in Laboratory Medicine. Williams & Wilkins 2a ed. Baltimore 1986; 515-536.

COLVIN HJ, SHERRIS JC: Electrical impedance measurements in the reading and monitoring of broth dilution susceptibility tests. Antimicrob Agents Chemother 1977; 12: 61-66.

CRUMPLIN GC, SMITH JT: Nalidixic acid: an antibacterial paradox. Antimicrob Agents Chemother 1975; 8: 251-255.

CRUMPLIN GC, SMITH JT: Nalidixic acid and bacterial chromosome replication. Nature 1976; 260: 643-645.

DEBLANC HJ, CHARACHE P, WAGNER HN: Automatic radiometric measurement of antibiotic effect on bacterial growth. Antimicrob Agents Chemother 1972; 2: 360-366.

DEITZ WH, COOK TM,GROSS WA: Mechanism of action of nalidixic acid on Escherichia coli. J Bacteriol 1966; 91: 768-770.

DOW J, CHAZAL J, FRYDMAN AM. Transfer kinetic of pefloxacin into cerebrospinal fluid after one hour iv infusion of 400 mg in man. J Antimicrob Chemother 1986; 17 (Supp B): 81-87.

EAGLE H: The recovery of bacteria from the toxic effects of penicillin. J Clin Invest 1949; 28: 832-836.

EAGLE H, FLEISCHMAN R, MUSSELMAN AD: The bactericidal action of penicillin in vivo: the participation of the host and the slow recovery of the surviving organisms. Ann Inter Med 1950a; 33: 544-571.

EAGLE H, MUSSELMAN AD: The rate of bactericidal action of penicillin in vitro as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organismn. J Exp Med 1948; 88: 99-131.

EAGLE H, MUSSELMAN AD: The slow recovery of bacteria from the toxic effects of penicillin. J Bacteriol 1949; 58: 475-490.

EDLUND CH, LIDBECK A, KAGER L, NORD CE: Comparative effects of enoxacin and norfloxacin on human colonic microflora. Antimicrob Agents Chemother 1987; 31: 1846-1848.

ERICSSON HM, SHERRIS JC: Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collabotarive study. Act Pathol Microbiol Scand Sect. B 1971; 217: 1-90.

ERON LJ, HARVEY L, HIXON DL, PORETZ DM: Ciprofloxacin therapy of infections caused by Pseudomonas aeruginosa and other resistent bacteria. Antimicrob Agents Chemother 1985; 27: 308-310.

ESPOSITO S, GALANTE D, BARBA D, BIANCHI W, GAGLIARDI R, GIUSTI R: Efficacy and safety of ciprofloxacin in the treatment of UTIs and RTIs in patients affected by liver disease. Infection 1988; 16 (Suppl 1): 57-61.

FEDERAL REGISTER: Rules and regulations. Antibiotic susceptibility disks. Federal Register 1972; 37: 20525-20529.

FEDERAL REGISTER: Rules and regulations. Antibiotics susceptibility disks: correction. Federal Register 1973; 38: 2576.

FERNANDES PB, HANSON CW, STAMM JM, VOJTKO C, SHIPKOWITZ NL, MARTIN E: The frequency of in vitro resistence development to fluoroquinolones and the use of murine pyelonephitis model to demonstrate selection of resistence in vivo. J Antimicrob Chemother 1987; 19: 449-465.

FOLLATH F, BINDSCHEDLER M, WENK M, FREI R, STALDER H, REBER H: Use of ciprofloxacin in the treatment of Pseudomonas aeruginosa infections. Eur J Clin Microbiol 1986; 5: 236-240.

FONG IW, LEDBETTER WH, VANDERBROUCKE AC, SIMBUL M, RAHM V: Ciprofloxacin concentrations in bone and muscle after oral dosing. Antimicrob Agents Chemother 1986; 29: 405-408.

FOULDS J: tolF locus in Escherichia coli: chromosomal location and relationship of loci cmlB and tolD. J Bacteriol 1976; 128: 604-608.

FUAD N, FRERE TM, GHUYSEN TM, DUEZ C, IWATSUBO M: Mode of interaction between ß-lactam antibiotics and the exocellular DD-carboxypeptidase-transpeptidase from Streptomyces. R39. Biochem J 1976; 155: 623-629.

FUUSTERD K: Post-antibiotc effect of ciprofloxacin on Pseudomonas aeruginosa. Eur J Clin Microbiol 1987a; 6: 271-274.

FUUSTERD K: Post-antibiotics effect and killing activity of ciprofloxacin against Staphylococcus aureus. Acta Pathol Microbiol Inmunol Scand 1987b; 95: 199-202.

FUURSTED K: Comparison of the post-antibiotic effect of Streptococcus faecalis and Streptococcus faecium with ampicillin alone or combined with streptomycin: studies on a novel type of antimicrobial interaction. Acta Pathol Microbiol Inmunol Scand 1987c; 95: 351-354.

GAVAN TL, TOWN MA: A microdilution method for antibiotic susceptibility testing: an evalation. Am J Clin Pathol 1970; 53: 880-885.

GELLERT M: DNA topoisomerases. An Rev Biochem 1981; 50: 879-910.

GELLERT M, MIZUUCHI K, O'DEA MH, ITOH T, TOMIZAWA JI: Nalidixic acid resistance: a second character involved in DNA gyrase activity. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 1977; 74: 4772.

GELLERT M, MIZUUCHI K, O'DEA MH, NASH HA: DNA gyrase: An enzyme that introduces superhelical turns into DNA. Proceeding of the National Academy of Sciences (USA) 1976a; 73: 3872.

GELLERT M, O'DEA MH, ITOH T, TOMIZAWA JI: Novobiocin and coumermycin inhibit DNA gyrase supercoiling catalysed by DNA gyrase. Proceedings of the National Academy of Sciences

(USA) 1976b; 73: 4474.

GEORGOPAPADAKOU NH, KIU FY: Penicillin binding proteins in bacteria. Antimicrob Agents Chemother 1980; 18: 148-57.

GERBER AU, CRAIG WA: Growth kinetics of respiratory pathogens after short exposures to ampicillin and erithromycin in vitro. J Antimicrob Chemother 1981; 8 (Suppl): 81-91.

GERBER AU, CRAIG WA, BRUGGER HP: Impact of dosing intervals on activity of gentamicin and ticarcillin against Pseudomonas aeruginosa in granulocytopenic mice. J Infect Dis 1983; 147: 910-917.

GERBER AU, FELLER C, BRUGGER HP: Time course of the pharmacological response to ß-lactam antibiotics in vitro and in vivo. Eur J Clin Microbiol 1984; 3: 592-597.

GERBER AU, WIPRCHTIGER P, STETTLER-SPICHIGER U, LOBEK G: Constant infusions vs. intermittent doses of gentamicin against Pseudomonas aeruginosa in vitro. J Infect Dis 1982; 145: 554-560.

GOBERNADO M, SANTOS M: Fluorquinolonas: estructura, actividad in vitro, mecanismo de acción y resistencia. Medicine 1988; 9 (Suppl): 33-40

GOLDSTEIN EJC, CITRON DM, CORRADO ML: Effect of inoculum size on in vitro activity of norfloxacin against fecal

anaerobic bacteria. Am J Med 1987; 82 (Supp 6B): 84-87.

GRASO S, MEINARDI G, DE CARNERI I: New in vitro model to study the effect of antibiotic concentration and rate of elimination on antibacterial activity. Antimicrob Agents Chemother 1978; 13: 570-576.

GUDMUNSON S, VOLGEMAN B, CRAIG WA: The in-vivo postantibiotic effect of imipenem and other new antimicrobials. J Antimicrob Chemother 1986; 18 (Suppl. E): 67-73.

GUTEKUNST RR: Rapid procedures under development and evaluation: bioluminescence and impedance measurement. En: A Bondi, JE Prier (ed). The clinical laboratory as an aid in chemotherapy of infectious disease. University Park Press. Baltimore 1977; 85-100.

HANE MW, WOOD TH: Escherichia coli K-12 mutants resistent to nalidixic acid: genetic mapping and dominance studies. J Bacteriol 1969; 99: 238-241.

HESSEN MT, PITSAKIS PG, LEVISON ME: Absence of a Postantibiotic effect in experimental Pseudomonas endocarditis treated with imipenem, with or without gentamicin. J Infect Dis 1988; 158: 542-548.

HESSEN MT, PITSAKIS PG, LEVISON ME: Postantibiotic effect of penicillin plus gentamicin versus Enterococcus faecalis in vitro and in vivo. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33:

608-611.

HIGGINS NP, PEEBLES CL, SUGINO A, COZARRELLI NR: Purification of subunits of Escherichia coli DNA gyrase and reconstitution of enzymatic activity. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 1978; 75: 1773.

HIRASHIMA A, CHILDS G, INOUYE M: Differential inhibitory effects of antibiotics on the biosynthesis of envelope proteins of Escherichia coli. J Mol Biol 1973; 79: 373-89.

HONORATO J, SUAREZ JR, ARANZA JR: Farmacología de las fluorquinolonas. Medicine 1988;.9 (Supp): 41-47.

HOOPER DC, WOLFSON JS, SOUZA KS, TUNG C, MC HUGH GL, SWARTZ MN: Genetic and biochemical characterization of norfloxacin resistence in Escherichia coli. Antimicrob Agents Chemother 1986; 29: 639-644.

HOOPER DC, WOLFSON JS, NG EY, SWARTZ MN: Mechanism of action and resistence to ciprofloxacin. Am J Med 1987; 82 (Suppl 4A): 12-20.

HOROWITZ DS, WANG JC: Mapping the active site tyrosine of E. coli DNA gyrase. J Biol Chem 1987; 262: 5339-5344.

INOUE S, OHUE T, YAMAGISHI J, NAKAMURA S, SHIMIZU M: Mode of incomplete cross-resistence among pipemidic, piromidic and nalidixic acids. Antimicrob Agents Chemother 1987; 14: 240-245.

ISAKSSON B, NILSON L, MALLER R, SOREN L: Postantibiotic effect of aminoglycosides on Gram-negative bacteria evaluated by a new method. J Antimicrob Chemother 1988; 22: 23-33.

JONES RN, EDSON DC: Interlaboratory performance of disk agar diffusion and dilution antimicrobial susceptibility tests, 1971-1981. Am J Clin Pathol 1982; 78 (Suppl): 651-658.

JOHNSON JE, JORGENSEN JH, CRAWFORD SA, REDDIN JS, PRUNEDA RC: Comparison of two automated instrument system for rapid susceptibility testing of Gram-negative bacilli. J Clin Microbiol 1983; 18: 1301-1309.

KITZIS MD, GUTMANN L, ACAR JF: Recovery period after exposure of Staphylococcus aureus to subinhibitory and bactericidal concentrations of rifampicin: clinical implications. J Antimicrob Chemother 1984; 13: (Suppl C): 1-7.

KLATERSKY J, DANEAU D, SWINGS G, WEERTS D: Antibacterial activity in serum and urine as a therapeutic guide in bacterial infections. J Infect Dis 1974; 129: 187-193.

KNOTHE H: In vitro activity of gyrase inhibitors. Quinolones Bulletin 1984 (Oct.): 4-5.

KRESKEN M, WEIDEMANN B: Development of resistence to nalidixic acid and the fluoroquinolones after introduction

of norfloxacin and ofloxacin. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32: 1285-1288.

KUENZI B, SEGESSENMANN C, GERBER AU: Postantibiotic effect of roxithromycin, erythromycin and clindamycin against selected gram-positive bacteria and Haemophilus influenzae. J Antimicrob Chemother 1987; 20 (Suppl B): 39-46.

KUNST MW, MATTIE H: Cefazolin and cephradine: relationiship between antibacterial activity in vittro and in mice experimentally infected with Escherichia coli. J Infect Dis 1978; 137: 391-402.

LEE C, BLASSER J, LUTHY R: Postantibiotic effect (PAE) is markedly influenced by shaking conditions during exposure to antibiotic concentrations. En: Program and abstract of the XXII Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1982-Abstract.

LESHER GY, FROELICH EJ, GRUETT MD, BAILEY JH, BRUNDAGE RP: 1,8- Naphthyridine derivatives, a new class of chemotherapy agents. J Medi Chem 1962; 5: 1063-1067.

LIDA K, KOIKE M: Cell wall alterations of gram negatives bacteria by aminoglycoside antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 1974; 5: 95-97.

LIU LF, ROWE TC, YANG L, TEWEY KM, CHEN GL: Cleavage of DNA by mammalian DNA topoisomerase II. J Biol Chem 1983; 258: 15365.

LIU LF, WANG JC: Micrococcus luteus DNA gyrase: active components and a model for its supercoiling of DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 1978; 75: 2098.

LOPEZ-BREA M, ALARCON T, BAQUERO M, LOPEZ-LAVID C, SANZ JC, JIMENEZ ML: Sensibilidad antimicrobiana de cepas de Shigella a las nuevas fluorquinolonas. Rev Esp Quimioterap 1990; 3: 83-85.

LORIAN V: Effect of low antibiotic concentrations on bacteria: efects on ultrastructure, their virulence and susceptibility to inmunodefenses. En: Antibiotics in laboratory medicine. Williams and Wilkins 2a ed. Baltimore 1986; 596-668.

LOUIS TJ, SIMAR D, AOKI FY, KRULICKI W, et al: Effects of oral ciprofloxacin on the fecal flora in normal volunteers. Clinical and Intest Med 1985: 8-Abstract.

LOWENTRITT LL, SCHLEGEL JU: Treatment of bacteriuria in patients with impaired renal function. J Urol 1969. 102: 473-477.

MAESEN FPV, DAVIES BI, TEENGS JP: Pefloxacin in acute exacerbations of chronic bronchitis. J Antimicrob Chemother 1985; 16: 379-388.

MC ALLISTER TA, PERCIVAL A, ALEXANDER JG, BOYCE JMH, DULAKE:

Multicentric study of sensitivities of urinary tract phatogens. Postgraduate Med J 1971; 47(Suppl): 7-11.

MC DONALD PJ, CRAIG WA, KUNIN CM: Brief antibiotic exposure and effect on bacterial growth. En: JD Williams, AM Geddes (ed), Chemotherapy, vol 2. Plenum. New York 1976; 95-102.

MC DONALD PJ, CRAIG WA, KUNIN CM: Persistent effect of antibiotics on Staphylococcus aureus after exposure for limited periods of time. J Infect Dis 1977; 135: 217-223.

MC DONALD PJ, HAKENDORF P, PRUUL H: Recovery period of bacteria after brief exposure to N-formimidoyl-thienamycin and others antibiotics. En: Current Chemotherapy and immunotherapy Proceedings of the 12th International Congress of Chemotherapy-1981. P Periti and GG Grassi (ed). American Society for Microbiology. Washington DC 1982; 741-743.

MC DONALD PJ, WETHERALL BL, PRUUL H: Postantibiotic leukocyte enhancement: Increased susceptibility of bacteria pretreated with antibiotics to activity of leukocytes. Rev Infect Dis 1981; 3: 38-44.

MAC LOWRY JD, MARSH HH: semiautomatic microtechnique for serial dilution-antibiotic sensitivity testing in the clinical laboratory. J Lab Clin Med 1968; 72: 685-687.

MICHEA-HAMZEHPOUR M, PECHERE JC, MARCHOU B, AUCKENTHALER R: Combination therapy: a way to limit emergency of resistence? Am J Med 1986; 80 (Suppl 6B): 138-142.

MILATOVIC D, BRAVENY I: Development of resistence during antibiotic therapy. Eur J Clin Microbiol 1987; 6: 234-244.

MILLER KG, LIU LF, ENGLUND PT: A homogeneus type II DNA topoisomerase from HeLa cell nuclei. J Biol Chem 1981; 256: 9334-9339.

MILLER RV, SCURLOCK TR: DNA gyrase (topoisomerase II) for Pseudomonas aeruginosa. Biochem Biophis Res Comunication 1983. 110: 694-699.

MINGUEZ F, REDONDO M, APARICIO P, CORRALES I , PRIETO J: Efecto postantibiotico de amoxicilina mas acido clavulanico sobre Escherichia coli y Staphylococcus aureus. Rev Esp Microbiol Clin 1988; 8: 551-557.

MINGUEZ F, CORRALES I, GOMEZ-LUS ML, LURUEÑA S, PRIETO J: Valoración del efecto postantibiótico de cinco grupos de antimicrobianos sobre Staphylococcus aureus y Escherichia coli. Rev Esp Quimioterap 1989a; 2: 161-165.

MINGUEZ F, GOMEZ-LUS ML, REDONDO M, CORRALES I, PRIETO J: Efecto postantibiótico de amoxicilina y netilmicina sobre cultivos puros y asociados de S. aureus y E. coli. Rev Esp Microbiol Clin 1989b; 4: 419-424.

MOLINARI G, BANDELLONI R, PAGLIA P, DEBBIA E, SCHITO EC: In vitro antimicrobial activity and Postantibiotic effect of lomefloxacin, a new difluorquinolone. Diagn Microbiol Infect Dis 1989; 12: 53-56.

MOODY JA, GERDING DN, PETERSON LR: Evaluation of ciprofloxacin's synergism with other agents by multiple in vitro methods. Am J Med 1987; 82 (Suppl 4A): 44-54.

MOORHEAD PJ, PARRY HE: Treatment of sonnei dysentery. Brit Med J 1965; 2: 913-915.

MORRISON A, COZZARELLI NR: Site specific cleavage of DNA by Escherichia coli DNA gyrase. Cell 1979; 17: 175-179.

MULLIGAN ME, RUANE PJ, JOHNSTON L, WONG P, WHEELOCK JP, MAC DONALD K, REINHARDT JF, JOHNSON CC: Ciprofloxacin for eradicacation of methicillin-resistent Staphylococcus aureus infection. Am J Med 1987; 82 (Suppl 4A): 215-219.

MUNSHI MH, HAIDER K, RAHAMAN MM, SACK DA, AHMED ZH, MORSHED MG: Plasmid mediated resistence to nalidixic acid in Shigella dysenteriae type 1. Lancet 1987; 11: 419-421.

MURAKAWA T, SAKAMOTO H, HIROSE T, NISHIDA M: New in vitro kinetic model for evaluating bactericidal efficacy of antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 1980; 18: 377-381.

MURPHY PG, FERGUSON WP: Corynebacterium jeikeium (group JK) resistance to ciprofloxacin emerging during therapy. J Antimicrob Chemother 1987; 20: 922-926.

NAKAMURA S, INOUE S, SIMIZU M, IYOBE S, MITSUHASHI S: Inhibition of conjugal transfer of plasmids by pipemidic acid and related compounds. Antimicrob Agents Chemother

1976; 10: 779-785.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS: Performance standards for antimicrobials dosks susceptibility tests. M2-T3. NCCLS 1983, Villanova, Pa.

NEWSOM SWB, MURPHY P, WARREN RE, MATTHEWS J: Clinical studies with ciprofloxacin. Chemoter 1985; 4 (Suppl 2): 415-416.

NIGHTINGALE J: clinical limitations of in vitro testing of microorganism susceptibility. Am J Hosp Pharm 1987; 44: 131-137.

NISHIDA M, MURAKAWA T, KAMIMURA T: Bactericidal activity of cephalosporins in an in vitro model simulating serum levels. Antimicrob Agents Chemother 1978; 14: 6-12.

ODENHOLT I, HOLM SE, CARS O: An in vivo model for evaluation of the postantibiotic effect. Scand J Infect Dis 1988; 20: 97-103

ODENHOLT I, ISAKSSON B, NILSSON L, CARS O: Postantibiotic and bactericidal effect of imipenem against Pseudomonas aeruginosa. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1989; 8: 136-141.

PALLERONI NJ: Genus Pseudomonas. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Sneat PHA. NS Mair, ME Sharpe, JG Holt (ed). 1a ed. Williams & Wilkins. Baltimore 1984: 141-149.

PARKER RF, LUSE S: The action of Peniciline on Staphylococcus: Further observations on the effect of a short exposure. J Bacteriol 1948; 56: 75-81.

PARKER RF, MARSH HC: The action of penicillin on Staphylococcus. J Bacteriol 1946; 51: 181-186.

PIFFARETTI JC, DEMARTA A, LEIDI-BULLA L, PEDUZZI R: In vitro emergence of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa strains resistent to norfloxacin and nalidixic acid. Eur J Clin Microbiol 1983; 2: 600-601.

PRICE JR: Some reactions of 1-methyl-4-quinolone-3 carboxylic acid, a degradation product of the alcaloids. Austr J Sci Res 1949; 217: 272-281.

PRUUL H, LEWIS G, MC DONALD PJ: Enhanced susceptibility of gram negative bacteria to phagocitic killing by human polimorphonuclear leucocytes after brief exposure to aztrteonam. J Antimicrob Chemother 1988; 22: 675-686.

PRUUL H, MC DONALD PJ: Enhanement of leukocyte activity against Escherichia coli after brief exposure to chloramphenicol. Antimicrob Agents Chemother 1979; 16: 695-700.

PRUUL H, WETHERALL BL, MAC DONALD PJ: Enhanced susceptibility of Escherichia coli to intracellular killing by human polymorphonuclear leukocytes after in vitro

incubation with chloramphenicol. Antimicrob Agents Chemother 1981; 19: 945-951.

RACTCLIFFE NT, SMITH JT: The mechanism of reduced activity of 4-quinolone agents in urine. Fortschr Antimikrob Antineoplast Chemother 1984; 3: 563-569.

RACTLIFFE NT, SMITH JT: Norfloxacin has a novel bactericidal mechanism unrelated to that other 4-quinolones. J Pharm Pharmacol 1985; 37: 92-95.

REEVES DS: The effect of quinolone antibacterials on the gastrointestinal flora compared with that of other antimicrobials. J Antimicrob Chemother 1986; 18 (Suppl D): 89-102.

RENNEBERG I, WALDER M: Postantibiotic effect of imipenem, norfloxacin and amikacin in vitro and in vivo. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33: 1714-1720.

RESCOTT DL, NIX DE, HOLDEN P, SCHENTAG JJ: Comparison of two methods for determining in vitro postantibiotic effects of three antibiotics on Escherichia coli. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32: 450-453.

ROBILLARD NJ, SCARPA AL: Genetic and physiological characterization of ciprofloxacin resistence in Pseudomonas aeruginosa PAO. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32: 535-539.

RYAN JL, BERENSON CS, GRECO TP, MANGI RJ, SIMS M, THORNTON GF, ANDRIOLE VT: Oral ciprofloxacin in resistenct urinary tract infections. Am J Med 1987; 82 (Suppl 4A): 303-306.

RYLANDER M, NORRBY SR, SVARD R: Norfloxacin versus co-trimoxazole for treatment of urinary tract infections in adults: microbiological results of a coordinated multicentre study. Scand J Infect Dis 1987; 19: 551-557.

SANDERS CC, SANDERS WE, GOERING RV: Overview of preclinical Studies with Ciprofloxacin. Am J Med 1987; 82 (Suppl 4A): 2-11.

SCHLICHTER JG, MAC LEAN H: A method of determining the efective therapeutic level in treatment of subacute bacterial endocarditis with penicillin. Am Heart J 1947; 34: 209-211.

SCHLICHETER JG, MAC LEAN H, MALZER A: Effective penicillin therapy in subacute bacterial endocarditis and other chronic infections. Am Heart J 1949; 217: 600-608.

SCULIER JP, KLATERSKY J: Sinificance of serum bactericidal activity in gram-negative bacillary bacteremia in patients with and without granulocytopenia. Am J Med 1984; 76: 429-435.

SCULLY BE, NEU HC, PARRY MF, MANDEL W: Oral ciprofloxacin therapy of infections due to Pseudomonas aeruginosa. Lancet 19[illegible]; 1: 819-822.

SHAH PM: Bactericidal activity of ampicillin and amoxycillin. J Antimicrob Chemother 1981; 8 (Suppl): 93-99.

SHIMADA K, KATO H: Schedule of intermittent cephalotin therapy. En: JD Williams, AM Geddes (ed). Chemotherapy, vol 5. Plenum. New York 1976; 277-282.

SHOENKNECHT FD, SABATH LD, THORNSBERRY C: Pruebas especiales de susceptibilidad. En: EH Lennette, A Balows, WJ Hausler, HJ Shadomy (ed). Manual de Microbiología clínica. American Society for Microbiology, 4a ed.Washington DC 1985; 1239-1249.

SMITH JT: Frequency and expression of mutational resistence to 4-quinolone antibacterials. Scand J Infect Dis 1986; 49 (Suppl): 115-123.

SMITH JT: Awakening the slumbering potential of the 4-quinolone antibacterials. Pharm J 1984; 233: 299-305.

SMITH JT, LEWIN CS: Chemistry and mechanism of action of the qinolone antibacterials. En: The quinolones, VT Andriole (ed). Academic Press. London 1988; 23-82.

SMITH GM, LEYLAND MJ, GARREL ID, GEDDES AM: Preliminary evaluation of ciprofloxacin, a new 4-quinolone antibiotic, in the treatment of the febrile neutropenic patient. J Antimicrob Chemother 1986b; 18 (Suppl D): 165-174.

SMITH JT, RATCLIFFE NT: Einflub von pH-wert und Magnesium

auf die antibakterielle aktivitat von Chinolonpraparaten. Infection 1986; 14 (Suppl 1): 31-35.

SNEDECOR GW: Stadistical Methods. 5a ed. State College Press. Iowa 1956.

SPRATT BG: The mechanism of action of penicillin. Sci Prog 1978; 65: 101-128.

SPRATT BG, TOLANPUTRA V, ZIMMERMAN W: Binding of thienamycin and clavulanic acid to penicillin-binding proteins of E. coli K-12. Antimicrob Agents Chemother 1977; 12: 406-409.

STAMEY TA, NEMOY NJ, HIGGINS M: The clinical use of nalidixic acid, a review and some observations. Invest Urol 1969; 6: 582-587.

STEERS E, FOLTZ EL, GRAVES BS, RIDEN J: An inocula replicating apparatous for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. Antibit Chemother 1959; 9: 307-311.

STEINBAKK M, CARLSTEDT DUKE B, HOEVERSTAD T: Fecal concentrations of 10 orally given antimicrobial agents and influence upon 7 intestinal biochemical microflora-associated charasteristics. 9th Internat. Congr. Infect & Parasit Dis. Muchen 1986-Abstract.

STUBNER G, WEINRICH W, BRANDS U: Study of the cerebrospinal fluid penetrability of ofloxacin. Infection 1986; 8 (Supp 4): 250-25

STUDENT GW: Biometrika 1907; 5: 351.

SUGINO A, PEEBLES CL, KREUZER KN, COZZARELLI NR: Mechanism of action of nalidixic acid: Purification of Escherichia coli nal-A gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 1977; 74: 4767.

TAMURA T, IMAE Y, STROMINGER JL: Purifications to homogeinity and properties of two D-alanine carboxy-peptidases I from Escherichia coli. J Biol Chem 1976; 252: 414-423.

TAUBER MG, ZAK O, SHELD WM et al: The Postantibiotic effect in the treatment of experimental meningitis cused by Streptococcus pneumoniae in rabits. J Infect Dis 1984; 149: 575-583.

THAUVIN C, LEMELAND JF, HUMBERT G, FILLASTRE JP: Efficacy of pefloxacin-fosfomycin in experimental endocarditis caused by methicillin resistent Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32: 919-921.

THORNSBERRY C, BAKER CN: Antimicrobial susceptibility tests for bacteria. En: A Balows, WJ Hausles (ed), Bacterial Mycotic and parasitic infections. American Public Health Association, 6a ed. Washington DC 1981; 747-766.

THORNSBERRY C, SHERRIS JC: Pruebas de laboratorio en

quimoiterapia. En: EH Lennette, A Ballows, WS Hausler, HJ Shadomy (ed). Manual de Microbiología Clínica. American Society for Microbiology 4a ed. Washington DC 1985; 1191-1199.

TOMASZ A: From penicillin binding proteins in the lysis and death of bacteria: a 1979 view. Rev Infect Dis 1979; 1: 434-467.

TURNIDGE JD, GUDMUNSON S, CRAIG WA: Postantibiotic effect (PAE) of antifungal agents against common pathogenic yeast. En: Program and abstract of the XXII Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1982. Abstract

VAN DER AUWERA P: Interaction of gentamicin, dibekacin, netilmicin and amikacin with various penicilins, cephalosporins, minocycline and new quinolones against Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa. J Antimicrob Chemother 1985; 16: 581-587.

VAN SAENE JJM, VAN SEANE HKF, LERK CF: Inavtivation of quinolone by feces. J Infect Dis 1986; 153: 999-1000.

VOLGEMAN B, CRAIG WA: Post-antibiotics effect. J Antimicrob Chemother 1985; 15 (Suppl A): 37-46.

VOLGEMAN B, CRAIG WA : Kinetics of antimicrobial activity. J Pediatr 1986; 108: 835-840.

VOLGEMAN B, GUDMUNSSON S, CRAIG W: Reduced susceptibility of

bacteria during the postantibiotic effect (PAE) to cidal antimicrobials. En: Program and Abstract of the XXIII Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1983-Abstract.

VOLGEMAN B, GUDMUNDSSON S, TURNIDGE J, LEGGETT J, CRAIG WA: In vivo postantibiotic effect in a thigh infection in neutropenic mice. J Infect Dis 1988; 157: 287-298.

WANG JC: Interactions between twisted DNAs and enzymes: the effect of superhelical turns. J Molec Biol 1974; 87: 797-781.

WASHINGTON JA: Bactericidal tests. En: Laboratory procedures in clinical microbiology. Springer-Verlag (ed). New York 1981; 715-723.

WEISBLUM B, DAVIES J: Antibiotic inhibitors of the bacterial ribosome. Bacteriol Rev 1968, 32: 493-528.

WEISSER J, WIEDEMANN B: Elimination of plasmids by new 4-quinolones. Antimicrob Agents Chemother 1985; 28: 700-702.

WHITE A, HANDLER P, SMITH EL, HILL RL, LEHMAN IR: Principles of biochemistry, 6a ed. McGraw Hill Kogakusha (ed). Tokio 1978; 185-802.

WILSON DA, ROLINSON GN: The recovery period following exposure of bacteria to penicillins. Chemother 1979; 25: 14-22.

WOLFF M, BURE A, PATHE JP, PANGON B, REGNIER B, ROUGER-BARBIER D, VACHON F: Evolution des resistences bacteriennes a la pefloxacine dans le service de reanimation de l'hopital Claude-Bernard. En: Pocidalo JJ, Vachon f, Regnier B. (ed), Les nouvelles quinolones. Editions Arnette, Paris 1985; 213-226.

WOLFSON JS, HOOPER DC: The fluoroquinolones: structures, mechanism of action and resistence, and spectra of activity in vitro. Antimicrob Agents Chemother 1985; 28: 581-586.

WOLFSON JS, HOOPER DC: Mechanism of action and of resistence to quinolone antimicrobial agents. En: Wolfson JS, Hooper DC (ed): Quinolone antimicrobial agents. American Society for Microbiology. Washington DC 1989; 5-34.

WOLFSON JS, HOOPER DC, NG EY, SOUZA KS, MC HUGH GL, SWARTZ MN: Antagonism of wildetype and resistent Escherichia coli and its DNA gyrase by the tricyclic 4-quinolone analogs ofloxacin and S-25930 steroisomers. Antimicrob Agents Chemother 1987; 31: 1861-1863.

WORCEL A: Studies on the folded chromosome of Escherichia coli. En: Kolberg & Kohiyama (Eds). Mechanism and regul ion of DNA replication. Plenum Press, New York and London 1974; 201-224.

YAMAGISHI J, YOSHIDA H, YAMAYOSHI M, NAKAMURA S: Nalidixic acid-resistent mutations of the gyrB gene of Escherichia

coli. Mol Gener Genet 1986, 204: 367-373.

YOSHIDA H, KOJIMA T, YAMAGISHI J, NAKAMURA S: Quinolone-resistence mutations of the gyrA gene of Escherichia coli. Mol Gener Genet 1988, 211: 1-7.

YOURASSOWSKY E, VAN DER LINDEN MP, LISMONT MJ, CROKAERT F: Growth curve patterns and regrowth in postantibiotic period of Escherichia coli exposed to ampicillin and amoxycillin. J Antimicrob Chemother 1983; 11: 333-338.

ZEILER HJ, CROHE K: The in vitro and in vivo activity of ciprofloxacin. Eur J Clin Microbiol 1984; 3: 339-343.

ZUSMAN DR: Membrane protein synthesis in Escherichia coli: sensitivity of chloramphenicol. Arch Biochem Biophys 1973; 159: 336-341.