



Universitat Autònoma de Barcelona

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**  
**DEPARTAMENT DE MEDICINA**

**TESI DOCTORAL**

**VALORACIÓ DEL TRACTAMENT DE LA**  
**INFECCIÓ DEL CATÈTER EN UN MODEL**  
**ANIMAL MITJANÇANT L'ADMINISTRACIÓ**  
**LOCAL D'ANTIBIÒTICS**

**Josep Fortea i Busquets**

**Directors: Dr. Albert Pahissa i Berga**  
**Dr. Josep Antoni Capdevila i Morell**

**Abril 2002**

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA  
DEPARTAMENT DE MEDICINA**

**TESI DOCTORAL**

**VALORACIÓ DEL TRACTAMENT DE LA  
INFECCIÓ DEL CATÈTER EN UN MODEL  
ANIMAL MITJANÇANT L'ADMINISTRACIÓ  
LOCAL D'ANTIBIÒTICS**

**JOSEP FORTEA I BUSQUETS**

**Llom . J. FORTEA  
TESI DOCTORAL  
ANY 2002**

“Hem d'afrontar el repte amb realisme i il.lusió per a poder aconseguir l'èxit; però també amb el sentit de l'humor necessari per a conèixer les nostres pròpies limitacions.”

W.Churchill

## **AGRAÏMENTS.**

Com sempre que es gesta un treball d'aquestes característiques en el si d'una Universitat i durant un període llarg de temps, són moltes les persones que hi han ajudat directa o indirectament i que no es poden oblidar quan el treball arriba a la seva fi.

En primer lloc voldria agrair al Dr. Albert Pahissa i Berga i al Dr. Josep Antoni Capdevila i Morell la tasca de codirecció d'aquest treball.

Molt especialment vull agrair al Dr. Albert Pahissa i Berga l'haver permès que col.laborés en el Laboratori de Malalties Infeccioses de la Vall d'Hebron, entorn idoni per a la realització dels experiments. Pel seu suport, la seva ajuda i constant interès en què aquest treball arribés a bon terme.

Al Dr. Josep Antoni Capdevila i Morell, en Josep Anton, li agraeixo la seva aportació fonamental a l'estudi, la seva desinteressada ajuda i orientació constant. La informació que m'ha proporcionat i els seus consells durant la preparació d'aquest manuscrit, han estat molt valuosos. Valoro molt la seva amistat i accesibilitat, i el seu suport continuat.

Al Dr. Joan Gavaldà i Santapau, en Joan, li vull agrair l'haver-me iniciat i conduït en el camp de la investigació experimental que sempre m'havia atret i que m'ha arribat a fascinar a mida que avançava la realització d'aquest treball. La seva claretat d'idees ha estat cabdal pel treball. I no puc oblidar la seva trucada ara ja fa uns anys, que va suposar el desitjat inici de la meua col.laboració amb el laboratori.

Als tres per haver confiat en mi per a portar a terme aquest treball.

Al Dr. Pedro López i a la Dra. Maite Martín per la seva revisió qualificada i crítica dels materials i mètodes; per les explicacions i ajuts que m'han ofert, imprescindibles per a poder realitzar els experiments.

Vull agrair també el suport d'en Xavier Gomis, d'en Pep Ramírez, per la seva companyia i col.laboració.

A tots ells, companys del Laboratori Experimental de Malalties Infeccioses de la Vall d'Hebron, el meu sincer agraïment pel seu suport durant la realització dels experiments i pel que hem pogut compartir al Laboratori.

Vull posar de manifest també el meu agraïment a la Dra. Leonor Pou, perquè sense la seva col.laboració desinteressada en els mètodes de l'estudi, les determinacions d'alguns paràmetres no haurien estat possibles.

També ha estat molt important per a mi l'entorn familiar, especialment el meu pare i la meva mare, que ens van animar sempre a estudiar i ens van fer créixer a la meva germana i a mi en un entorn d'estímul constant de l'aprenentatge i la curiositat. Ells em van fer entendre que el fruit del demà no s'obté sense el treball de cada dia.

Als amics i amigues més properes que heu viscut amb mi el període que he dedicat a realitzar aquest treball. A tots els que m'heu sentit a parlar de la famosa tesi, que semblava que no s'acabaria mai, i que us heu interessat sincerament per ella; a les persones que m'heu esperat quan he arribat tard per estar enfeinat tractant conills o fent dilucions també vull fer-vos arribar el meu agraïment.

Finalment, vull agrair a Q.F.Bayer i molt especialment al Dr. Josep E. Baños la seva actitud i col.laboració per a poder portar a terme aquest treball.

Aquest treball s'ha pogut realitzar perquè també ha estat finançat amb la beca FISS nº95/1297. "Valoración de la eficacia de ciprofloxacino o vancomicina en el tratamiento "in situ" de la sepsis por catéter en el modelo animal de la infección de catéter".

***Als meus pares***

<p style="text-align: center;"><b>VALORACIÓ DEL TRACTAMENT DE LA INFECCIÓ DEL CATÈTER EN UN MODEL ANIMAL MITJANÇANT L'ADMINISTRACIÓ LOCAL D'ANTIBIÒTICS</b></p>
---

<b>ÍNDIX</b>	<b>pàgina</b>
<b>0- ABREVIATURES</b> .....	<b>1</b>
<b>I- INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>3</b>
1.1- Incidència de la infecció per catèter. Cost econòmic .....	<b>4</b>
1.2- Epidemiologia .....	<b>6</b>
1.3- Etiologia .....	<b>9</b>
1.4- Fisiopatologia .....	<b>11</b>
1.4.1- Colonització del catèter. A) Via extraluminal .....	<b>11</b>
B) Via intraluminal .....	<b>12</b>
C) Sembra hematògena .....	<b>13</b>
1.4.2- Formació de la biocapa. Fisiopatologia .....	<b>14</b>
- Interacció entre bacteri/ biomaterial .....	<b>16</b>
- Interacció biomaterial/ mecanismes de defensa .....	<b>17</b>
- Interacció biomaterial/ antimicrobià .....	<b>17</b>
- Interacció antimicrobià/ biocapa .....	<b>17</b>
1.5- Mètodes diagnòstics .....	<b>18</b>
1.5.1- Diagnòstic clínic .....	<b>18</b>
1.5.2- Diagnòstic microbiològic de la infecció .....	<b>19</b>
1.5.2.1- Mètodes aplicats <u>amb la retirada del catèter</u> .....	<b>20</b>
1.5.2.2- Mètodes aplicats <u>sense la retirada del catèter</u> .....	<b>25</b>
1.6- Tipus d'infecció de catèter. Definicions .....	<b>31</b>
1.7- Tractament .....	<b>32</b>
1.8- Models experimentals .....	<b>38</b>
1.8.1- In vitro. Models amb botelles .....	<b>39</b>
1.8.2- In vivo. Models animals .....	<b>39</b>
1.8.2.1- Tipus de models animals .....	<b>40</b>
1.8.2.2- Aspectes ètics i legislatius .....	<b>45</b>
<b>II- HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS</b> .....	<b>47</b>
2.1- Hipòtesi de treball .....	<b>47</b>
2.2- Objectius .....	<b>47</b>

<b>III- MATERIAL I MÈTODES.</b> .....	<b>48</b>
3.0- Microorganisme .....	<b>48</b>
3.1- Estudis “in vitro” per avaluar l’activitat de diverses pautes antibiòtiques de tractament de les infeccions de catèter per <i>S. aureus</i> .....	<b>49</b>
3.1.1- CIM i CBM d’heparina i antibiòtics.....	<b>49</b>
3.1.2- CIM i CBM de vancomicina, ciprofloxacina i rifampicina en front de bacteris en biocapes.....	<b>56</b>
3.1.3- Avaluació “in vitro” de l’activitat antimicrobiana de combinacions de vancomicina o ciprofloxacina amb heparina o rifampicina .....	<b>61</b>
3.1.3.1- Vancomicina o ciprofloxacina i heparina .....	<b>62</b>
3.1.3.2- Vancomicina o ciprofloxacina i rifampicina .....	<b>62</b>
3.2- Avaluació de l’estabilitat de les combinacions de vancomicina o ciprofloxacina amb heparina o rifampicina .....	<b>65</b>
3.2.1- Estabilitat de vancomicina o ciprofloxacina amb heparina.....	<b>66</b>
3.2.2- Estabilitat de vancomicina, ciprofloxacina i rifampicina soles o en combinació .....	<b>66</b>
3.2.2.1- Procediments del bioassaig .....	<b>67</b>
3.3- Estudis en el model animal d’infecció per catèter .....	<b>72</b>
3.3.1- Descripció del model animal .....	<b>72</b>
3.3.1.1- Animal .....	<b>72</b>
3.3.1.2- Microorganisme .....	<b>72</b>
3.3.1.3- Catèter .....	<b>73</b>
3.3.1.4-Tècnica quirúrgica.....	<b>73</b>
3.3.1.4.1- Anestèsia .....	<b>74</b>
3.3.1.4.2- Inserció del catèter.....	<b>75</b>
3.3.1.5- Infecció.....	<b>77</b>
3.3.1.6- Avaluació microbiològica .....	<b>79</b>
3.3.1.6.1- Hemocultiu perifèric i transcatèter .....	<b>79</b>
3.3.1.6.2- Sacrifici de animal.....	<b>81</b>
3.3.1.6.3- Tècnica d’extracció del catèter .....	<b>82</b>
3.3.1.6.4- Procediments d’avaluació de la infecció del catèter. Cultius de la punta del catèter.....	<b>83</b>
1- Rentat .....	<b>83</b>
2- Rodatge .....	<b>84</b>
3- Sonicat.....	<b>84</b>
3.3.1.7- Tractament.....	<b>85</b>
3.3.2- Estudis d’eficàcia terapèutica mitjançant antibiòtic-lock en el model de sèpsia per catèter .....	<b>89</b>



3.3.2.1- Eficàcia de l'heparina, vancomicina i ciprofloxacina soles o en combinació .....	89
3.3.2.2- Eficàcia de vancomicina, ciprofloxacina i rifampicina soles o en combinació .....	89
1. Estudis terapèutics .....	89
2. Avaluació de l'aparició de resistències .....	89
3.4- Proves estadístiques .....	90
<b>IV- RESULTATS.</b> .....	<b>92</b>
4.1- Estudis "in vitro" per avaluar l'activitat de diverses pautes antibiòtiques de tractament de les infeccions de catèter per <i>S. aureus</i> .....	92
4.1.1- CIM <sub>50/90</sub> i CBM <sub>50/90</sub> d'heparina i antibiòtics .....	92
4.1.2- CIM i CBM de vancomicina, ciprofloxacina i rifampicina en fase de creixement exponencial, estacionari i adherent .....	94
4.1.3- Avaluació "in vitro" de l'activitat antimicrobiana de combinacions de vancomicina o ciprofloxacina amb heparina o rifampicina .....	105
4.1.3.1- Vancomicina o ciprofloxacina i heparina .....	105
4.1.3.2- Vancomicina o ciprofloxacina i rifampicina.....	114
4.2- Avaluació de l'estabilitat de les combinacions de vancomicina o ciprofloxacina amb heparina o rifampicina .....	126
4.2.1- Estabilitat de vancomicina o ciprofloxacina amb heparina.....	126
4.2.2- Estabilitat de vancomicina, ciprofloxacina i rifampicina soles o en combinació .....	127
4.3- Estudis en el model animal d'infecció per catèter .....	128
4.3.1- Estandardització del model animal .....	128
4.3.2- Estudis d'eficàcia terapèutica mitjançant antibiòtic-lock en el model de sèpsia per catèter .....	129
4.3.2.1- Eficàcia de l'heparina, vancomicina i ciprofloxacina soles o en combinació .....	129
4.3.2.2- Eficàcia de vancomicina, ciprofloxacina i rifampicina soles o en combinació .....	133
1. Estudis terapèutics .....	133
2. Avaluació de l'aparició de resistències .....	136
<b>V- DISCUSIÓ.</b> .....	<b>139</b>
<b>VI- CONCLUSIONS.</b> .....	<b>156</b>

**VII- BIBLIOGRAFIA..... 158**

**0- ABREVIATURES.**

ALT	Tècnica de l'Antibiòtic-Lock
APACHE	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation
ATP	Adenosin Trifosfat
ATCC	American Type Culture Collection
C	Ciprofloxacina
°C	Graus centigrats
CBM	Concentració Bactericida Mínima
CDC	Centers for Disease Control
CEE	Comunitat Econòmica Europea
CIM	Concentració Inhibitòria Mínima
cm	centímetres
DS	desviació estàndard
EPINE	Estudio de Prevalencia de Infección Nosocomial en España
g	grams
h	hores
H	Heparina
HQP	Hemocultiu Quantitatiu Perifèric
HQT	Hemocultiu Quantitatiu Transcatèter
Hz	Hertz
i.v.	intravenós
Kg	kilogram
Log/log <sub>10</sub>	logaritme
mg	miligram
MHB	Brou de Mueller Hinton amb cations ajustats
MHS	Agar de Mueller Hinton suplementat amb 5% de sang de bé
µg	microgram
µL	microlitre
mL	mililitre
mm	milímetre
n	número

NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PBS	Tampó Bufer Sulfat
PCR	Proteïna C reactiva
PSS	Polianetolsulfonat sòdic
PVC	Polivinilclorat
R	Rifampicina
rpm	revolucions per minut
SIDA	Síndrome d'Inmunodeficiència Adquirida
SPC	Sèpsia per catèter
spp	espècies
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
$t_{1/2}$	Vida mitjana
UCI	Unitat de Cures Intensives
ufc	unitats formadores de colònies
U	Unitats
UI	Unitats Internacionals
V	Vancomicina

## I- INTRODUCCIÓ.

Els dispositius intravasculars predisposen a la infecció pel fet que danyen o atravesen les barreres epitelials, la qual cosa permet l'accés directe dels microorganismes al torrent circulatori. A més, els catèters endovenosos, i els cossos estranys en general, faciliten el creixement de microorganismes i poden actuar com a reservoris, pel fet que dificulten els mecanismes de defensa de l'hoste. Una vegada contaminats, els microorganismes adherits als cossos estranys s'hi multipliquen i posteriorment poden causar una infecció al pacient (1). Estudis fets amb microscopia electrònica troben que gairebé tots els catèters vasculars que es retiren, fins i tot aquells que tenen els cultius negatius, estan colonitzats per microorganismes (2).

La incidència estimada d'infecció dels catèters centrals de curta durada és d'entre el 3-7%. Per contra, els catèters centrals implantats per llarg temps (p.e. Broviac i Hickman) tenen una incidència menor, d'entre el 1-2% (3).

La sèpsia per catèter representa aproximadament la tercera causa de bacterièmia nosocomial i és una causa important de morbiditat i mortalitat (1). Estudis recents en malalts ingressats en Unitats de Cures Intensives troben una mortalitat global associada a la sèpsia per catèter del 10% (4). Malgrat això, la inserció de línies vasculars és un dels actes mèdics que, ja sigui amb finalitats diagnòstiques o terapèutiques, més es produeix als pacients hospitalitzats.

Als Estats Units d'Amèrica, més del 50% dels pacients ingressats han necessitat un catèter intravascular en algun moment de la seva estada hospitalària i el 1983 un estudi multicèntric europeu trobava que el 63% dels pacients ingressats era portador d'algun dispositiu intravascular (5,6).

Aquesta elevada incidència de la infecció del catèter, deguda a la seva inserció o al seu manteniment, dona lloc a l'increment de la morbiditat, de la mortalitat i de la despesa sanitària, i fa necessària l'aplicació d'unes estrictes normes en el maneig dels pacients portadors de catèters per a evitar-la. La investigació de les tècniques de prevenció i de tractament d'aquesta infecció és l'objectiu que ha de plantejar-se per a la milloria del maneig del pacient, de

la seva qualitat de vida i poder obtenir així un estalvi econòmic pel sistema sanitari.

En cas, però, que es produeixi la infecció, el seu tractament clàssicament comportava la retirada del catèter i un tractament antibiòtic sistèmic segons el microorganisme aïllat (7,8,9). Treballs recents (9,10,11,12) confirmen, no obstant, que sota certes circumstàncies clíniques un catèter infectat pot ser tractat sense que calgui la seva retirada. Aquest plantejament és d'indubtable interès en els malalts que necessiten el catèter durant llargues temporades i la inserció dels quals ha de realitzar-se en els quiròfans, com en els malalts hematoncològics, en hemodiàlisi o en nutrició parenteral domiciliària.

El tractament de la infecció mantenint el catèter comporta l'administració d'antibiòtics sistèmics per a erradicar la infecció i aconseguir, a més, l'esterilització del catèter. Però cal tenir present que l'esterilització del mateix es pot aconseguir també mitjançant l'administració d'antibiòtics a través del catèter infectat o bé també omplint el catèter d'una solució antibiòtica que actuï localment durant els períodes en què aquest no es fa servir (tècnica de l'antibiòtic-lock) (13).

En aquest treball pretenem estudiar algun dels interrogants que planteja el tractament local del catèter amb antibiòtics per aconseguir la seva esterilització.

### **1.1- Incidència de la infecció per catèter. Cost econòmic.**

Es calcula que a països com els Estats Units d'Amèrica, la infecció per catèter representava el 1978 el 45% de les infeccions nosocomials (1). Dades espanyoles la situen el 1997 al voltant del 20-30% amb una mortalitat associada del 6-10% (14,15).

A l'Hospital Gregorio Marañon de Madrid la prevalença de la infecció deguda a catèter l'any 1988 era del 15% (16). Als hospitals de la Vall d'Hebron de Barcelona els estudis fets de la bacterièmia per catèter durant un període de 5 anys (1986-1991) troben que representa la tercera causa de bacterièmia nosocomial després de la bacterièmia primària i la urològica.

La taxa d'infecció varia, però, segons diferents variables considerades: així per exemple, és major quan major és el nivell de complexitat de les tècniques

realitzades a cada centre. A més, a les UCI entre el 3% i el 7% dels catèters venosos centrals s'infecten i produeixen sèpsies (17) que van associades amb un allargament de l'estada hospitalària i una elevada taxa de mortalitat, especialment en malalts crítics (4,18).

Segons dades de l'EPINE del 1994, de totes les infeccions detectades a malalts amb línies vasculars, el 13% eren bacterièmies. Aquest percentatge augmentava en el cas dels catèters centrals d'inserció perifèrica (17,6%), en els centrals (20,4%) o als usats per nutrició parenteral (20,1%). Cal tenir present, però, que les dades que aporta l'EPINE són dades indirectes d'infecció ja que en aquest tipus d'estudis no sempre es realitzen els cultius del catèter per a confirmar l'origen de la infecció (19).

Com a complicacions, les sèpsies per catèter poden cursar amb endocarditis de cor dret en un 2-10% dels casos (15), així com altres infeccions per disseminació que ocasionalment poden suposar la mort del pacient (20). El risc de complicacions, però, és major quan l'agent etiològic és *S. aureus*, *Candida spp* o *Pseudomonas spp* i també en cas d'infeccions polimicrobianes (21).

Com qualsevol complicació que es pugui donar en un pacient, el seu tractament es tradueix també en un increment de costos pel sistema sanitari. De l'excés de costos derivat de la bacterièmia nosocomial, més del 80% correspon a la perllongació de l'estada hospitalària (estimada entre 8,5 i 14 dies), seguit del consum de farmàcia i de les proves complementàries (4,6%) (22, 23, 24). En general, però, és un número reduït de pacients el que ocasiona la major part de la despesa (25).

És per tot l'indicat que qualsevol tècnica desenvolupada per al tractament i la prevenció d'aquestes infeccions i que eviti la perllongació de l'estada hospitalària es demostrarà cost-efectiva. Aquest és el cas del tractament intravenós domiciliari (26) i de l'antibiòtic-lock (13,27).

Per altra banda, en relació als costos de les tècniques diagnòstiques, i aplicant els estàndards del College of American Pathologists Workload Recording Method Procedure de 1992 (28), les proves més econòmiques són

l'hemocultiu qualitatiu transcatèter i el cultiu qualitatiu del catèter, i la més cara és la dels hemocultius quantitius transcatèter (29). És important destacar que no es troben diferències en els costos de laboratori associats al diagnòstic de microorganismes que requereixen l'aplicació de bateries diagnòstiques més complexes (30). Tenint en compte les dades de sensibilitat i especificitat de les diferents tècniques així com les dels costos de cadascuna d'elles, es pot dir que les tècniques de baixa especificitat (hemocultiu qualitatiu transcatèter), malgrat el seu menor cost, poden suposar un increment de la despesa pel tractament de pacients amb resultats falsos positius (29).

De la mateixa manera que en moltes altres patologies, les mesures de prevenció universals aplicades a la inserció de catèters són altament cost-efectives (1,30,31). A més a més, algunes mesures especials com els catèters impregnats amb clorhexidina-sulfadiazina argèntica, amb antibiòtics (32) o els nous models de connexió (Segur-lock®) (33) tot i que són lleugerament més cars, disminueixen el risc de bacterièmia relacionada amb catèter en més d'un 50%, disminueixen l'estada hospitalària (34) i milloren, per tant, la qualitat de vida dels pacients (35).

Finalment, cal tenir en compte pel que fa als costos de la infecció de catèter el número d'estades hospitalàries que suposen els malalts que desenvolupen una bacterièmia (24,25).

## **1.2- Epidemiologia.**

Els factors de risc de les infeccions associades a catèter identificats són múltiples i els podem dividir en dos grups: els associats al pacient, poc modificables, i els associats al catèter, que orienten les mesures preventives que s'han de desenvolupar.

### **\*\*\* Factors lligats al pacient:**



Un dels factors importants relacionats amb la infecció per catèter és la malaltia de base del portador (12,36,37,38). Dins els pacients oncològics, els que pateixen tumors sòlids són els de més risc a patir infeccions relacionades amb el catèter (12). Tot i això, la patologia de base no és tant la variable que condiciona aquest fet com la intensitat del tractament, la diferent freqüència d'ús dels catèters i la durada de la neutropènia (12).

Les alteracions a les defenses de l'hoste ja siguin generals, com la granulocitopènia i la quimioteràpia immunosupressora, o locals com les cremades també són importants. En el cas de malalts afectes de SIDA, s'ha trobat que tenen major incidència i precocitat en l'aparició d'infeccions degudes a catèter (39). Aquest fet pot ser degut entre altres al compromís de la immunitat en aquesta població, a una menor cura en la neteja dels catèters per part dels malalts i a diferències en el maneig intraoperatori en el moment de la inserció del catèter (39).

La malnutrició també juga un paper afavoridor de les infeccions per catèter (36).

Un altre dels factors importants és la patologia acompanyant com la síndrome del distres respiratori, el xoc sèptic, la fallida multiorgànica, la ventilació mecànica, la fallida hepàtica crònica, la fallida renal aguda o una puntuació a l'escala APACHE II major o igual de 15 en el moment del diagnòstic (4). La presència d'una infecció concomitant, per exemple d'una ferida quirúrgica, o una traqueostomia contigua a un catèter jugular o de subclàvia també suposen un risc incrementat de presentar una infecció, en aquest cas, per la mateixa espècie bacteriana (36,40,41).

Quan els pacients segueixen tractament domiciliari, la incidència de bacterièmies és menor que en els casos dels pacients hospitalitzats (37), amb una taxa de bacterièmia de 2 per 1000 catèters i dia, tot i que variables com la patologia de base i la freqüència d'ús també poden influir en aquesta dada.

Per altra banda, el fet que les infeccions es presentin més freqüentment en menors d'1 any i majors de 60 anys (38,42), en homes, lligat però a la patologia de base, i en obesos (42) fa que variables com l'edat, el sexe i el pes dels pacients siguin variables a considerar en relació a aquest tipus d'infeccions.

**\*\*\* Factors lligats al catèter:**

El que un catèter sigui perifèric o central és una de les variables principals que influencia el risc d'infecció. Els catèters perifèrics tenen menys risc d'infecció que els centrals, en estar menys dies inserits (43). Tot i això, per dia d'inserció, els perifèrics s'infecten més que els centrals (44,45).

En el cas dels catèters de llarga durada, els que tenen reservori tenen un temps lliure d'infecció major que els externalitzats (12,46). Treballs nord-americans troben una prevalença d'infecció associada a catèter de l'1% als perifèrics i de fins al 21% als centrals (47), però cal tenir en compte que aquest fet ve condicionat per la durada de la cateterització.

Amb l'increment del número de llums del catèter, el risc d'infecció també és major (3,48), fins a tres vegades (49,50), probablement degut a que estan sotmesos a un nombre major de manipulacions (51). Hi ha estudis que demostren, però, que el risc d'infecció no varia si el catèter té 2 o 3 llums (52).

El material del catèter també és una variable important en aquestes infeccions. Per ordre de freqüència d'infecció: els de polietilè són els que més freqüentment en presenten seguits dels de PVC, tefló, poliuretà i silicona (5). Els de silicona i poliuretà són més elàstics, menys trombogènics i flebitogènics que els de PVC, polietilè i tefló.

El número de dies d'hospitalització previs a la infecció (4), el servei d'admissió del pacient, per ordre decreixent d'importància: UCI, Unitat coronària, quiròfan, planta d'hospitalització; i la freqüència d'ús del mateix (3,42,53) són altres variables importants a tenir en compte i que influencien l'aparició de les infeccions per catèter.

Pel que fa a les variables relacionades amb la inserció del catèter la unitat de col.locació del catèter també té importància. Són, per ordre decreixent de risc: UCI, urgències, planta d'hospitalització i quiròfan. A més, si la cateterització és urgent té més risc d'infecció que si és electiva. També el tipus de col.locació, ja que per punció té menys risc que per dissecció, i la dificultat de col.locació del catèter, també s'han de tenir en compte (54).

El lloc de la inserció ja sigui jugular, subclàvia, femoral o antecubital (55), ja que la col.locació a les extremitats inferiors té més risc que a les superiors i la inserció jugular més que a la subclàvia (44) també ho influencien, així com el

recanvi del catèter amb guia metàl·lica o no. Si s'usa guia, s'incrementa el risc (48,56), ja que es facilita la transmissió dels microorganismes del catèter antic al nou inserit. Tot i això, les dades en aquest punt són contradictòries: hi ha autors que no troben ni increment ni disminució del risc d'infeccions amb l'ús de guia metàl·lica (57,58). S'està d'acord en què el seu ús disminueix la incidència de complicacions mecàniques (59), però incrementa el risc d'embolització sèptica (60,61).

Pel que fa a variables relacionades amb el manteniment del catèter ja inserit, s'han de desenvolupar mesures destinades a evitar la colonització de la pell i/o de la connexió, com la utilització de pomada de povidona iodada a la unió de la connexió/ sistema d'infusió, l'ús d'apòsits, ja siguin normals o transparents- tot i que no són transpirables i, per tant, incrementen les infeccions-, les cures del catèter (62) i vetllar per la disminució del número de manipulacions.

En resum, es pot dir que de tots els factors de risc d'infecció per catèter, els més significatius són: el número de dies d'hospitalització abans de la infecció, especialment quan supera els 14 dies, el lloc de la cateterització i el tipus de catèter, el número de catèters col·locats i els dies de cateterització total.

Altres factors de risc importants associats són la presència d'una infecció concomitant i la durada inadient de la cateterització (63).

### 1.3- Etiologia.

A continuació es detallen els principals agents etiològics de la sèpsia per catèter independentment de l'origen de la infecció:

<p><b>* Gram positius:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. <i>Staphylococcus aureus</i></li> <li>. <i>Staphylococcus epidermidis</i></li> <li>. <i>Streptococcus spp</i></li> <li>. <i>Corynebacterium spp</i></li> <li>. <i>Bacillus spp</i></li> </ul>	<p><b>* Fongs:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. <i>Candida albicans</i></li> </ul> <p><b>* Altres:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. <i>Mycobacterium spp</i></li> <li>. <i>Rhodotorula spp</i></li> </ul>
<p><b>* Bacils gram negatius:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>No fermentadors:</u></li> </ul>	

<p>. <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p>- <u>Enterobacteris:</u></p> <p>. <i>Enterobacter spp, Klebsiella spp, Citrobacter spp,...</i></p>
--

Taula 1.3. Agents etiològics.

Les infeccions de catèter solen ser infeccions produïdes per un únic microorganisme, tot i que en algunes sèries els estudis de biologia molecular troben diferents soques d'estafilococs plasmocoagulassa negatius infectant el catèter (53,64).

Els microorganismes més freqüentment aïllats són els *Staphylococcus epidermidis* (4,34,42,53,65,66,67,68,69,70,71,72,73), degut a que formen part de la flora cutània normal, tenen pocs requeriments nutritius i gran capacitat d'adherència i colonització de les superfícies plàstiques, gràcies a la producció de slime (5,54). Aquests tenen una menor tendència a produir bacterièmies que no altres microorganismes més virulents (16,74). També dins el grup dels cocs gram positius, *S. aureus* té major facilitat per produir bacterièmies i una reconeguda tendència a produir metàstasis sèptiques en forma d'endocarditis i osteomielitis (5,54,75,76,77).

Altres microorganismes aïllats, per ordre de freqüència, són: *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *Candida spp*, *Enterobacter spp* i *Acinetobacter spp*.

L'agent etiològic més freqüent també canvia si considerem la patologia de base dels pacients. Per exemple, dins la població de malalts hemofílics i oncològics, les infeccions estafilocòciques i per *Corynebacterium spp* (23), són més freqüents en malalts portadors de reservoris i els microorganismes

gram negatius són més freqüents en malalts portadors de catèters externs (12,78).

Altres microorganismes més infreqüents són: bacils gram negatius com *Proteus spp* (79,80), *Yersinia spp* o *Serratia spp* (79), o bé altres com *Flavobacterium spp* (81,82), micrococs, *Neisseria spp* (81), o *Rhodotorula spp* (82), i *Mycobacterium spp*, en casos d'immunosupressió important (83,84).

Aquest ampli ventall de microorganismes causals és el que fa necessari l'acurar les bateries diagnòstiques en els aïllaments dels cultius dels malalts amb sospita clínica d'infecció per catèter (85).

## 1.4- Fisiopatologia.

### 1.4.1- Colonització del catèter.

D'acord amb l'anterior, a les infeccions associades a catèter, l'arribada dels microorganismes es produeix bàsicament per dos mecanismes:

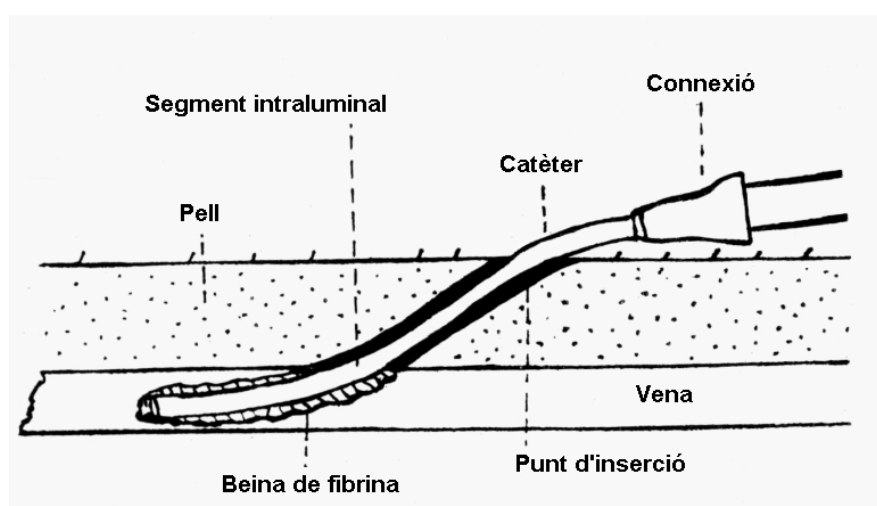


Fig 1. Esquema del catèter en posició. Extret de: Maki DG. Infections associated with intravascular lines. A: Remington JS., Swartz MN., ed. Current clinical topics in infectious diseases. McGraw Hill Book Company, New York, 1982:309-63.(41)

**A) Via extraluminal**, per la superfície externa del catèter. Aquesta és la via més comuna de colonització del catèter (5,34,47).

El punt d'inserció és el punt més freqüentment identificat com a focus de microorganismes (2,14,74). La pèrdua de la integritat de la barrera cutània que suposa el punt d'inserció del catèter permet que des d'aquest els microorganismes avancin fins a la punta del catèter i a l'espai intravascular, entre la coberta externa del catèter i la beina de fibrina que es forma al voltant d'aquest.

La pel·lícula proteica que es forma al voltant del catèter cap a les 24-72 h de la seva implantació (2,86), està formada per fibronectina, laminina, col·lagen i

fibrina com a component fonamental (5). Aquesta pel·lícula facilita la implantació de microorganismes com *S. aureus*, que s'adhereixen fortament a proteïnes com la fibronectina, fibrinogen i en menor grau a laminina. Altres microorganismes com *S. epidermidis* s'adhereixen només a la fibronectina i no a d'altres components (2).

L'agent etiològic més freqüent d'aquesta via patogènica és *S. epidermidis* i destaquen també altres cocs gram positius com *S. aureus* i *E. faecalis*.

**B) Via intraluminal**, per l'interior del catèter a partir d'una connexió o bé a partir d'un líquid d'infusió contaminat.

### **B.1) Via intraluminal a partir d'una connexió.**

En el cas de les sèpsies per catèter on el focus és la connexió, el risc d'infecció està en relació fonamentalment amb el nombre de manipulacions de la connexió, de l'asèpsia amb què aquestes s'efectuen, de la seguretat de la tanca i del número de connexions. Se la considera el segon focus de la infecció (13, 87).

En aquest cas el microorganisme més freqüentment aïllat és també *S. epidermidis*, encara que *S. aureus*, *E. faecalis*, *C. albicans* i els bacils gram negatius tenen també un paper etiològic important.

Alguns dels estudis europeus de la fisiopatologia de la infecció del catèter troben que la via més freqüent de colonització és l'externa en un 56% dels casos, seguida de la interna en un 22% i en el 15% dels casos la via mixta és la que es presenta (16). Cal tenir present que, en general, pels investigadors nord-americans el mecanisme fisiopatològic més freqüent d'infecció és la progressió per la superfície externa mentre que pels europeus és la interna (88), tot i que són molts els que consideren que en aquesta infecció les dues vies estan correlacionades (89,90).

### **B.2) Via intraluminal a partir d'un líquid d'infusió contaminat.**

Aquest mecanisme és excepcional actualment i no suposa més de l'1% dels casos de bacterièmia per catèter (5,41,54). En els casos en què la sèpsia sigui deguda al líquid de nutrició parenteral, sang o hemoderivats, la contaminació es produeix en el procés d'elaboració per la qual cosa la seva presentació sovint és en forma epidèmica (1,41) i causa episodis molt greus pel pas massiu de microorganismes al torrent circulatori. Cal, doncs, que durant la preparació es segueixin al màxim les mesures d'asèpsia ja que, a més, la majoria de microorganismes poden créixer en el líquid de nutrició parenteral (91).

Quan és el líquid de nutrició parenteral la font de la infecció, *P. aeruginosa* i els bacils gram negatius dels gèneres *Enterobacter spp*, *Serratia spp* i *Klebsiella spp* són els més sovint responsables d'aquesta (5).

En el cas dels hemoderivats, es contaminen amb menys freqüència ja que es mantenen en refrigeració. S'han descrit casos, però, de contaminació per *Y. enterocolitica*, bacteri psicròfil que creix a 4° C (92,93).

Una altra via alternativa de contaminació poc freqüent és la:

**C) Sembra hematògena**, a partir d'un focus sèptic distant.

La colonització per via hematògena de la beina de fibrina del catèter per microorganismes procedents de d'altres focus només es dona en menys del 2% dels casos de sèpsia per catèter. Aquesta via és d'interès en els malalts oncohematològics per la mucositis i la facilitat de penetració de microorganismes al torrent circulatori, o en malalts portadors de d'altres catèters que a la vegada poden estar infectats i ser causa de bacterièmia.

S'ha observat que la perllongació dels dies de cateterització afavoreix el que la via endoluminal tingui més importància (94). En alguns casos, però, la via de producció de la infecció és mixta on dues portes d'entrada participen en la producció d'aquesta (47). Les infeccions que apareixen precoçment (abans del desè dia) són normalment degudes a la migració extraluminal dels microorganismes, mentre que aquelles que apareixen de forma tardana (després del trentè dia de la inserció) estan relacionades preferentment amb la colonització prèvia de la connexió i la posterior progressió intraluminal (94).

#### 1.4.2- Formació de la biocapa. Fisiopatologia.

Una vegada els microorganismes han arribat al catèter es produeixen interaccions entre els factors implicats en les infeccions associades a biomaterials plàstics: microorganisme i biocapes, biomaterial i mecanismes de defensa de l'hoste, factors als que s'han d'afegir les interaccions amb l'antibiòtic quan s'inicia el tractament (95,96).

La colonització de la pell o de les connexions és un fenomen dinàmic i complex que es modifica amb el temps d'inici del procés (97). En el cas del punt d'inserció, una vegada s'ha produït la colonització i l'adherència dels bacteris a la superfície del catèter (98,99), aquests es propaguen cap a l'interior del túnel dèrmic, potser suspesos en una fase líquida i propagats per l'acció de la capilaritat (100). Aquest procés es veu facilitat per la càrrega negativa dels microorganismes (especialment *S. epidermidis*) i la positiva dels teixits subcutanis respecte de la superfície cutània (101).

A la superfície del catèter els bacteris prenen dues formes: la forma adherent o sesil on estan envoltats pel biofilm; i la forma plactònica, forma lliure en la qual es disseminen per la superfície del catèter (2). La capacitat dels microorganismes de créixer "in vitro" en materials sintètics en condicions de manca de nutrients bàsics, reforça la idea de l'existència de mecanismes de supervivència que es posen de manifest sota condicions adverses (102).

Estudis fets amb *P. aeruginosa* troben que des del moment en què el bacteri s'adhereix al catèter es produeix un creixement exponencial fins al cinquè dia, a partir del qual la població es manté constant. Quan més profund és l'estrat en què es troben les cèl.lules, aquestes són metabòlicament menys actives, degut a les poques possibilitats que tenen d'accedir als nutrients essencials i, a més, pels problemes que els causa l'acumulació de metabolits tòxics. Els bacteris de la profunditat es troben en estat d'aquiescència i tenen compromesa la divisió cel.lular. La seva membrana és menys permeable a totes les substàncies. Per contra, les cèl.lules de la superfície de la biocapa són més semblants a les plactòniques (103). Això podria estar explicat per la presència de variants de colònies estafilocòciques petites, trobades en aïllaments clínics i en infeccions associades a cos estrany (104). Aquestes es



caracteritzen per un creixement lent i un reduït import de fàrmacs degut a una disminució del gradient electroquímic. Les alteracions metabòliques que resulten en aquesta alteració fenotípica de *S. aureus* poden ser explicades per la interrupció del transport d'electrons que comporta una disminució de la producció d'ATP (105,106). Els nivells disminuïts d'ATP se'ls considera responsables, entre d'altres, del lent creixement dels microorganismes (105,106).

La colonització dels catèters per microorganismes i els processos que afavoreixen la seva multiplicació venen afavorits per la formació de coàguls, ja que faciliten la contaminació dels catèters (86). De la mateixa manera, la infecció del catèter afavoreix la formació de trombus (36). Aquest risc incrementa amb el nombre de dies de cateterització (70,107).

Finalment, quan els microorganismes de la superfície del catèter, especialment els de la fase plactònica, excedeixin una concentració donada, es produirà la clínica d'infecció (2).

Comentem tot seguit les interaccions més importants entre els factors essencials implicats en les infeccions de catèter: bacteri i biocapa, biomaterial, mecanismes de defensa i antimicrobià, quan s'inicia el tractament.

#### **- Interacció entre bacteri/ biomaterial.**

La primera presa de contacte entre el bacteri i el biomaterial depèn d'interaccions físico-químiques d'entre les que destaquen les interaccions hidrofòbiques, la càrrega elèctrica de les superfícies i les forces de Van der Waals (entre núvols electrònics).

En el procés de fixació, els bacteris que tinguin superfícies hidrofòbiques tendiran a adherir-se a la superfície del biomaterial expulsant les gotes d'aigua que existeixen entre ells. Aquest primer contacte és inespecífic i reversible.

Posteriorment, es produeixen interaccions específiques irreversibles adhesina-receptor, que estableixen l'adherència de forma permanent.

En el cas concret de *S. aureus*, les adhesines estan constituïdes pels àcids lipoteicòics de la paret bacteriana i com a receptors intervenen les glicoproteïnes que de forma ràpida recobreixen la superfície del catèter una vegada s'introdueix a l'organisme. D'aquestes, la fibronectina és la més important.

Tot i així, en el cas de d'altres microorganismes com *S. epidermidis*, es sap que les glicoproteïnes anteriors no actuen com a mediadores de l'adherència i encara ara s'estudia quins són els seus mediadors tot i que la fibronectina sembla tenir un paper preponderant. És per això que es creu que l'especial afinitat és deguda a la capacitat d'aquest bacteri de produir el slime (108) o exopolisacàrid extracel·lular que recobreix i interrelaciona els bacteris que colonitzen la superfície del catèter, forma una barrera que els protegeix front el sistema immunitari i permet la seva multiplicació (109).

Al slime se li reconeix el paper d'actuar com a resina d'intercanvi iònic que optimitza el medi nutritiu local dels bacteris, evita la penetració de l'antibiòtic en la macrocolònia bacteriana i protegeix els bacteris dels mecanismes fagocítics de l'hoste (3). La seva producció i composició es pot veure influïda pels nutrients ambientals (110), l'atmosfera d'incubació (111), l'àcid acetilsalílic, altres antiinflamatoris no esteroidals (112) i els antimicrobians (103).

#### **- Interacció biomaterial/ mecanismes de defensa.**

La principal barrera defensiva front la majoria de bacteris i particularment *S. aureus* la constitueix la fagocitosi mediada pels leucòcits polimorfonuclears neutròfils. Si els bacteris es troben coberts per exopolisacàrids, l'opsonització i ingestió dels mateixos es veu àmpliament dificultada. Malgrat que cap dels catèters afecta la ingestió de bacteris pels polimorfonuclears, els materials com el tefló, el PVC, i els de làtex siliconitzat disminueixen significativament els mecanismes bactericides dels polimorfonuclears (bàsicament la producció de radicals peròxid), essencials per a la destrucció intracel·lular dels estafilococs (113).

#### **- Interacció biomaterial/ antimicrobià.**

La majoria d'antimicrobians amb activitat antiestafilocòcica no veuen afectada la seva activitat front aquests microorganismes per la presència del biomaterial tot i que com ja s'ha comentat, si pot influir el material en l'estructura de la biocapa (114,115).

Tot i això, en estudis fets en segments de làtex siliconitzat infectat per *P. aeruginosa* s'ha vist que la CIM del meropenem incrementava de 32-64 vegades en presència d'aquest material (116). A més, cal tenir en compte que la composició exacta dels biomaterials no és coneguda, particularment dels diferents aditius que s'afegeixen al polímer de base per a millorar la seva biocompatibilitat i propietats físiques. Algunes d'aquestes substàncies poden difondre al medi que envolta el material i interferir en alguns casos en l'activitat de l'antimicrobià (117). Aquest fet, però, no s'ha demostrat en estudis en catèters de PVC i diversos antimicrobians, incloent-hi la vancomicina, la ciprofloxacina i la rifampicina (117).

#### **- Interacció antimicrobià/ biocapa.**

En general, l'estat metabòlic latent o la baixa taxa de creixement d'alguns microorganismes els fa més resistents a l'activitat de l'antibiòtic, per disminució de la seva capacitat de penetració per problemes de permeabilitat o bé per disminució de la seva activitat en presència de slime, com en el cas de la vancomicina. L'activitat bacteriostàtica de vancomicina, ciprofloxacina i rifampicina és similar pels bacteris plactònics que pels adherits a PVC, però, en general, es pot afirmar que l'activitat bactericida dels antimicrobians és inferior a les biocapes bacterianes (117).

La interacció entre antimicrobià i biocapa es veu modificada en funció del tipus de material, fet que podria ser explicat per que sigui la natura de la biocapa la que varia en relació al material sobre el que s'estructura (113).

En models experimentals de biocapa, l'exposició dels estafilococs plasmocoagulassa negatius a concentracions subCIM de glicopèptids no modifica o disminueix lleugerament la seva adherència als catèters (103).

Els estudis fets amb quinolones i estafilococs plasmocoagulassa negatius, reflexen que les concentracions d'antibiòtic subCIM tenen un efecte indiferent o inhibidor de l'adherència (103), i estudis fets amb penicilines i cefalosporines troben també una inhibició de la producció del slime així com de l'adherència de *S. epidermidis* tot i que aquests estudis permeten afirmar que aquests canvis no són deguts a canvis en la hidrofobicitat de la superfície (118).

A més, en estudis "in vitro", en què s'administren antibiòtics una vegada la biocapa ja està formada, s'ha observat que es produeix una disminució de la densitat dels bacteris adherits i l'aparició d'una matriu de material fibrós a la superfície de la que els bacteris estan adherits (119).

### **1.5- Mètodes diagnòstics.**

#### 1.5.1- Diagnòstic clínic.

El diagnòstic d'infecció relacionada amb l'ús del catèter es basa inicialment en la sospita clínica (15), però calen per a la confirmació mètodes microbiològics. Donat que aquesta infecció normalment no va acompanyada de signes locals d'infecció, fet més evident en els catèters centrals (88), la presència de febre i/o manifestacions de sèpsia en un pacient cateteritzat en el que no aparegui cap signe de focalitat infecciosa, l'ha de fer sospitar (9).

La possibilitat de sèpsia per catèter incrementa quan hi ha:

- signes locals d'infecció.
- la febre és refractària a un tractament valorat com adequat.
- hi ha absència de focus sèptics alternatius.
- el microorganisme aïllat a l'hemocultiu és prevalent a la sèpsia per catèter (veure taula 1.3).
- hi ha associació entre l'ús del catèter i el pic febril.

Alguns altres dels aspectes a tenir en compte per a valorar l'associació entre la clínica d'infecció i el catèter com a font de la mateixa són: la durada de la cateterització, el tipus de catèter usat, la seva localització anatòmica i la funció del mateix.

En darrer lloc, la desaparició de la febre després de la retirada del catèter afiança el diagnòstic.

En qualsevol dels casos, la sospita clínica de la sèpsia per catèter ha de ser confirmada pels mètodes de cultiu microbiològics (120).

#### 1.5.2. Diagnòstic microbiològic de la infecció.

El diagnòstic microbiològic d'infecció per catèter es confirma mitjançant la demostració del microorganisme causal en el catèter. Donat que la infecció és intravascular, pot haver-hi bacterièmia. Aquesta serà continua i els hemocultius sempre positius, excepció feta dels catèters d'ús discontinu en els que la febre i la bacterièmia apareixen associades a l'ús del catèter (15).

Els mètodes diagnòstics que permeten estudiar les infeccions per catèter els podem classificar en dos grans grups en funció de si van acompanyats de la retirada del catèter o no (15):

##### 1.5.2.1- Mètodes aplicats amb la retirada del catèter (taula 1.5.2.1).

El principal problema que presenten aquests mètodes és que pel diagnòstic cal la retirada del catèter (3,9) i això pot comportar retirar innecessàriament molts catèters que després tindran els cultius negatius. Són els següents:

#### \* Mètodes aplicats amb la retirada del catèter:

- a) Cultiu qualitatiu**
- b) Cultiu semiquantitatiu**
- c) Cultiu quantitatiu.** Inclou les següents tècniques:
  - c.1. rentat del catèter**
  - c.2. vortejat del catèter**
  - c.3. sonicat del catèter**
  - c.4. rentat del catèter i cultiu semiquantitatiu**

**d) Examen microscòpic del catèter**

Taula 1.5.2.1.

**a) Cultiu qualitatiu.**

Aquesta és la tècnica inicial i més senzilla. Consisteix en submergir l'extrem distal del catèter (darrers 3-5 cm) en un medi de cultiu líquid durant 18-24 h. Ens aporta informació sobre la flora present al catèter però el creixement bacterià no ens permet la diferenciació entre contaminació, colonització i infecció i, per tant, discriminar si el catèter és la font de la infecció (120). Aquest és l'inconvenient fonamental de la tècnica. Això comporta que les taxes de positivitat siguin majors que les taxes de sèpsia relacionada amb catèter (121) i per tant que tingui un baix valor predictiu positiu (79). A més, l'elevada possibilitat de contaminació accidental d'aquesta tècnica és el que ha facilitat el desenvolupament de d'altres tècniques que tot seguit es descriuen.

**b) Cultiu semiquantitatiu.**

Fins la dècada dels setanta els mètodes microbiològics es basaven en la tècnica anterior ja que no és fins l'any 1977 que Maki i col.laboradors descriuen la tècnica de cultiu semiquantitatiu que sí permet el diferenciar entre colonització i infecció.

Aquesta consisteix en fer rodar l'extrem proximal del catèter almenys quatre vegades sobre una placa d'agar. A les 18-24 h d'incubació a 37° C es llegeix el resultat. Es va establir com a punt de tall d'infecció, ja sigui infecció local del catèter o bacterièmia, un recompte mínim de 15 ufc. En cas que els recomptes siguin inferiors es considera colonització del catèter (121,122).

El punt de tall de positivitat establert en 15 ufc o més s'ha considerat a partir d'estudis on els casos de bacterièmia tenien recomptes superiors a aquesta xifra mentre que els casos que cursaven sense simptomatologia clínica

general tenien recomptes inferiors. La sensibilitat és del 76% i té com a inconvenient fonamental que no detecta el 15% de bacterièmies d'origen endoluminal, la qual cosa es tradueix en la baixa sensibilitat de la tècnica per a diagnosticar les bacterièmies on és aquest el focus. Aquest punt de tall es pot veure modificat per altres variables del catèter i del malalt (87).

Tot i el comentat, aquest mètode no ha estat validat tenint en compte variables com el diàmetre, el tamany o el material del què està constituït el catèter, el microorganisme causant de la infecció o l'administració prèvia d'antibiòtics (123). A més, val a dir que el rodatge del catèter per la superfície d'una placa fa difícil que tot el segment del catèter entri en contacte amb la mateixa, la qual cosa suposa que la recuperació de microorganismes pugui no ser completa. Això s'ha demostrat pel fet que si després del rodatge fem una tinció de gram del catèter encara es troben bacteris adherits a la superfície (70). Una altra de les limitacions de la tècnica és que no recupera pel cultiu els microorganismes adherits a la superfície interna del catèter (70).

En general, aquesta tècnica té un baix valor predictiu per les bacterièmies (79). És per això que hi ha autors (124,125,126) que demostren que elevar el punt de tall de positivitat de la tècnica fins a 50 ufc dóna un increment de l'especificitat sense pèrdua de sensibilitat en el diagnòstic de la sèpsia per catèter ja que el punt de tall és massa conservador i pot, ocasionalment, identificar colonització com infecció (121).

No obstant aquests comentaris, aquest mètode s'ha convertit en el de referència del diagnòstic de la infecció per catèter i per a valorar nous mètodes diagnòstics (9). Basa la seva importància en la facilitat de realització i l'aplicabilitat als laboratoris clínics.

Se'l considera el mètode més senzill i cost-efectiu (88) pel diagnòstic de la sèpsia per catèter.

### **c) Cultiu quantitatiu.**

El primer a proposar aquestes tècniques pel diagnòstic de la infecció per catèter va ser Seligman el 1974 (127). Introduïdes posteriorment a la tècnica semiquantitativa, han permès millorar tant el diagnòstic com el coneixement de la patogènia de la infecció per catèter.

Hi ha diverses tècniques de cultiu quantitatiu. Són aquestes les que tenen major sensibilitat i especificitat, al voltant del 90% (29), pel diagnòstic de la infecció del catèter (128).

D'entre ells comentem:

### **c.1. Rentat de catèter.**

Ha estat el mètode desenvolupat per Cleri i col.laboradors (74). Aquest mètode detecta la colonització de la superfície interna i externa del catèter. Consisteix en submergir el catèter en dos mL de medi de cultiu líquid i posteriorment rentar tres vegades l'interior del catèter amb l'ajuda d'una xeringa. El punt de tall de positivitat està en  $10^3$  ufc/mL. Valors inferiors són considerats com intermedis, és a dir, com a possible colonització o com a estadi precoç d'infecció. Aquest criteri s'ha establert també a partir d'estudis dels casos de bacterièmia amb simptomatologia, els quals tenien recomptes superiors a aquesta xifra. Els casos que cursaven sense simptomatologia clínica tenien recomptes inferiors (129).

Es recomana el limitar l'ús de les tècniques de cultiu de la superfície intraluminal per aquells casos en què la colonització de la connexió és prevalent o que siguin usades amb finalitat d'investigació (124).

### **c.2. Vortejat del catèter.**

Una modificació a la tècnica anterior l'aporten Brun-Buisson i col.laboradors (68) que submergeixen el segment del catèter en un mL d'aigua destil.lada i després agiten durant un minut. Posteriorment, es sembra 0,1 mL de la suspensió a 37° C durant 24 h. El punt de tall de positivitat d'aquesta tècnica està establert com l'anterior en  $10^3$  ufc/mL i la seva sensibilitat és del 97,5% i l'especificitat del 88% en el diagnòstic de la bacterièmia per catèter (68).



Altres treballs realitzats posteriorment observen que recomptes de 100 ufc/mL en cultius quantitius de la superfície interna eren millors predictors de la infecció amb increments de la sensibilitat sense disminució de l'especificitat (130).

### **c.3. Sonicat del catèter.**

A la tècnica anterior es substitueix l'agitació per la sonicació i es submergeix el segment de catèter en un brou de cultiu i es sonica durant un minut. El punt de tall de positivitat d'aquesta tècnica està en  $10^3$  ufc/mL (131).

Es considera que el bany d'ultrasons és el millor mètode per la preparació dels catèters pel cultiu (132), tot i que hi ha investigadors que consideren que ni aquesta modificació ni el vortejat milloren substancialment les tècniques diagnòstiques de la sèpsia per catèter (120,131).

### **c.4. Rentat del catèter i cultiu semiquantitatiu.**

Fins ara el conjunt de tècniques quantitatives comentades tenen com a inconvenient fonamental el fet que no diferencien entre colonització/ infecció de la superfície interna i externa. Per a evitar aquest inconvenient Liñares i col.laboradors proposen el rentar la superfície interna del catèter amb dos mL de medi de cultiu i, posteriorment, cultivar el catèter pel mètode de Maki (133). Estudis realitzats posteriorment a la introducció de les tècniques esmentades demostren que tot i que la combinació de cultius de la superfície interna i externa és el millor mètode per al diagnòstic d'infecció en catèters, especialment en els de nutrició parenteral i d'hemodiàlisi, qualsevolga combinació de les tècniques quantitatives anteriors no aconsegueix una milloria substancial en el diagnòstic microbiològic de la infecció respecte de la tècnica semiquantitativa introduïda per Maki (16). A més, aquesta és la tècnica més ràpida i senzilla de realitzar. L'afegir tècniques com l'agitació o el sonicat per a incrementar el nombre de bacteris despresos del catèter produeix una disminució de l'especificitat sense un increment clar de la sensibilitat (125).

**d) Examen microscòpic del catèter.**

A diferència dels anteriors, que requereixen de 18-24 h de cultiu abans de l'obtenció de resultats, són mètodes que aplicats al catèter permeten el diagnòstic ràpid de la infecció del catèter. Es pot usar la **tinció de gram** descrita per Cooper i Hopkins (80) o la del **taronja d'acridina** descrita per McCarthy i Senne (134).

Per a la tinció de gram, cada catèter es submergeix en una placa de Petri que conté els diferents colorants de la tinció, cadascun dels quals s'aplica durant deu segons (80).

Per a la tinció del taronja d'acridina el catèter és immers en una solució d'acridina al 0,01% durant dos minuts (135).

Una vegada sec el catèter es fixa al porta per a la seva visualització al microscopi.

Pel que fa als estudis per a valorar la utilitat de la tècnica de gram com a diagnòstica de la colonització del catèter, aquests troben una sensibilitat del 100%, una especificitat del 96,9%, i un valor predictiu positiu i negatiu del 83,9% i 100%, respectivament (80).

Altres estudis troben que el taronja d'acridina té una major sensibilitat respecte la tinció de gram, tot i que això pot estar influenciat pel fet que el taronja es va realitzar abans que la tinció de gram; i, a la vegada, menor especificitat que la tinció de gram (135) tot i que resulta de més senzilla realització la tinció amb acridina que no el gram (16). Els estudis fets troben que en els casos de bacterièmia el taronja d'acridina va tenir un 100% de positivitat (16) i és especialment útil en els casos en els que no s'evidencia positivitat de l'hemocultiu després d'un dia d'incubació (135).

Les tècniques de tinció són importants per què permeten un diagnòstic ràpid de la infecció, ja que l'obtenció d'un resultat negatiu que descarti el catèter com a focus de la mateixa té implicacions pel tractament del pacient (88).

Tot i que hi ha diferents criteris quant a la seva sensibilitat i especificitat pel diagnòstic de la sèpsia per catèter, i per la seva facilitat de realització en tots

els laboratoris (135,136), en conjunt se les considera tècniques de baixa sensibilitat i especificitat (135,137) i només poden realitzar-se sobre superfícies plàstiques transparents i de parets primes (120). Pot ser realitzada fins i tot després del cultiu semiquantitatiu i dóna informació sobre la superfície interna i externa del catèter (80). Un resultat positiu dóna informació sobre els trets del microorganisme colonitzant.

#### 1.5.2.2. Mètodes aplicats sense la retirada del catèter (taula 1.5.2.2).

Són mètodes d'importància creixent pel desenvolupament d'estratègies terapèutiques per l'aplicació de les quals no cal la retirada del catèter. Aquests mètodes són:

#### \* Mètodes sense la retirada del catèter:

##### 1. Tècniques ràpides:

- a) Examen microscòpic del frotis de la pell del punt d'inserció i de la connexió.
- b) Prova del citospin i tinció del taronja d'acridina dels leucòcits.
- c) Tinció amb blau de tetrazolina dels leucòcits.
- d) Tinció de gram de la sang obtinguda a través del catèter.

##### 2. Cultius:

- e) Cultiu del frotis de la pell i de la connexió.
- f) Hemocultius quantitativs a través del catèter.
- g) Raspallat del catèter.

Taula 1.5.2.2.

#### 1. Tècniques ràpides:

En conjunt aquestes tècniques són útils pel diagnòstic però tenen com a inconvenient fonamental que són molt laborioses i que als laboratoris clínics no es disposa de personal durant les 24 h per a poder-les realitzar.

Són:

**a) Examen microscòpic del frotis de la pell del punt d'inserció i de la connexió.**

Aquests són, potser, els mètodes més fàcils de realitzar (120). Un resultat negatiu d'aquests és molt predictiu que el catèter no estigui infectat (15), amb la qual cosa es pot evitar la retirada del catèter (16). Això fa que es recomani la seva aplicació a grups d'elevada prevalença de sèpsia per catèter (136).

El valor predictiu d'infecció d'un resultat positiu amb aquestes tècniques és molt baix (136,138).

Estudis comparatius entre la tinció de gram del catèter i el cultiu semiquantitatiu troben que aquestes tècniques tenen una sensibilitat, especificitat i valors predictius semblants als del cultiu semiquantitatiu (80,136).

**b) Prova del citospin i tinció del taronja d'acridina.**

És un mètode que permet un diagnòstic més ràpid que els anteriors. Consisteix en centrifugar la sang extreta a través del catèter i fer una tinció amb taronja d'acridina dels leucòcits obtinguts.

La detecció de microorganismes equival a un resultat positiu de la tècnica (120,139).

**c) Tinció amb blau de tetrazolina dels leucòcits.**

La sang obtinguda a través del catèter s'incuba a 37° C durant 20 minuts amb blau de tetrazolina i, posteriorment, es centrifuga. D'aquesta manera s'obté un percentatge de neutròfils tenyits. Si el resultat obtingut és inferior o igual al 15% es considera un valor normal i positiu si és superior o igual al 20% (140).

La tinció del taronja d'acridina és la que presenta els millors resultats quant a sensibilitat i especificitat quan és comparada amb la tinció del blau de tetrazolina (140).

**d) Tinció de gram** de la sang obtinguda a través del catèter.

Consisteix en fer la tinció de gram de la sang obtinguda a través del catèter suposadament infectat per a detectar la presència de microorganismes causants de la infecció. En estudis fets en catèters centrals de pacients sotmesos a nutrició parenteral ha donat una sensibilitat del 61%, un valor predictiu positiu del 100% i un valor predictiu negatiu del 42% (141).

**2. Cultius:****e) Cultiu del frotis de la pell i de la connexió.**

Com s'ha dit, el frotis és potser el mètode més senzill de fer (120), però estudis realitzats per analitzar el valor del cultiu de la pell i de la connexió en el diagnòstic de la infecció troben que els frotis són tècniques que no tenen capacitat predictora positiva suficient (87). No obstant, s'obté un valor predictiu negatiu del 97% per la bacterièmia relacionada amb el catèter (16, 142).

**f) Hemocultius quantitativus** a través del catèter.

El fonament teòric d'aquesta tècnica es basa en el fet que la sang obtinguda a través del catèter infectat conté una concentració major de microorganismes que no la de la sang obtinguda per la punció d'una vena perifèrica, per l'efecte de dilució de la sang en el torrent circulatori i l'acció del sistema reticle-endotelial (120).

Wing i col.laboradors van ser els primers en descriure la utilitat d'aquesta tècnica en el diagnòstic de sèpsia per catèter (143), i altres les han corroborades posteriorment (144). Consisteix en comparar els resultats dels hemocultius obtinguts a través dels diferents catèters que porta el malalt amb l'hemocultiu de la sang obtinguda per venopunció directa a una vena perifèrica. Estudis posteriors com els de Capdevila i col.laboradors

estableixen que amb un recompte diferencial de colònies de la sang obtinguda a través del catèter responsable de la sèpsia que sigui almenys **quatre** vegades superior al de la sang obtinguda per venopunció directa, diagnostica la infecció relacionada amb el catèter amb una sensibilitat del 94% i una especificitat del 100% (71). De la mateixa manera, un hemocultiu quantitatiu amb un recompte aïllat de més de 100 ufc/mL obtingut a través del catèter d'un pacient amb sèpsia indica que aquest catèter és el focus de la infecció (71).

Hi ha alguns autors que consideren el punt de tall de positivitat de la tècnica en un recompte diferencial d'entre 5 i 10 vegades entre l'hemocultiu de la sang obtinguda a través del catèter suposadament infectat i el perifèric (74,142,145).

Els estudis fets en població hospitalària, tant en sales de medicina i de cirurgia com de cures intensives troben pel mètode una sensibilitat del 94% i una especificitat del 100% (71).

A més, el resultat d'aquesta tècnica no es veu afectat pel fet que el malalt estigui prenent o no tractament antibiòtic (71,89) i permet el diagnòstic d'aquelles sèpsies degudes a infecció de catèter també en els casos d'origen endoluminal (71,142).

Aquest mètode, a més de ser de demostrada utilitat per al diagnòstic de la sèpsia per catèter (142), pot servir per a monitoritzar l'efectivitat del tractament antibiòtic administrat al pacient (88).

Hi ha estudis que usen l'hemocultiu quantitatiu com a mètode de referència pel diagnòstic de la sèpsia per catèter (140) i tot i tenir un valor predictiu negatiu igual al del frotis cutani, té un valor predictiu positiu major (15).

Com a limitacions del mètode des del punt de vista fisiopatològic cal destacar que no permet diferenciar si el focus de la infecció es troba a la punta del catèter o a la connexió del catèter (146), però per altra banda també és el més cost-efectiu en el cas dels catèters de llarga durada (29,34).

Les tècniques microbiològiques usades per a la valoració del mètode són dues:

### *1. Tècnica de Shottmüller.*

Consisteix a realitzar plaques d'agar sang amb la pròpia sang del pacient. Es pot fer a la capçalera del llit del malalt o bé es pot transportar la sang amb tubs vacutainer al laboratori. Es pot usar com a anticoagulant l'heparina o bé el PSS, que té l'avantatge teòric sobre l'heparina el fet de ser menys tòxic pel creixement bacterià.

Aquesta tècnica permet l'obtenció de resultats en 16-24 h, és de fàcil realització, barata i no requereix ningun utilitatge complex.

### *2. Tècnica de la lisi-centrifugació.*

Aquesta tècnica és de més difícil realització i està sotmesa a més manipulacions, per la qual cosa el risc de contaminació és major. A la vegada, el fet que permeti una major recuperació de microorganismes es pot convertir en un inconvenient, ja que pot ser necessària la realització de dilucions per a fer un recompte acurat de la placa.

En qualsevol cas, el fet de ser una tècnica que quantifica les colònies recuperades permet també el conèixer l'evolució dels pacients, l'efectivitat del tractament antibiòtic administrat i conèixer si un catèter és o no la font de la infecció (147).

S'han desenvolupat mètodes automatitzats per als hemocultius quantitius que permeten que el nombre de microorganismes que es desenvolupen puguin ser suportats pels medis de cultiu a més de permetre que el volum de sang necessari pel diagnòstic sigui menor, amb un màxim de 3 mL de sang (148).

### **g) Raspallat del catèter.**

És una tècnica cara i complexa que implica el raspallat de la llum i de la superfície del catèter. Encara requereix, però, més estudis de validació i establir el punt de tall de positivitat (149,150).

Finalment, i donat que la majoria de sèpsies són produïdes per estafilococs plasmocoagulassa negatius i que aquest microorganisme és habitual de la flora sapròfita cutània i contaminant habitual dels cultius, és important per a

garantir el diagnòstic el desenvolupament de mètodes moleculars com l'**electroforesi de camp pulsàtil** com a tècnica que permet identificar si el microorganisme aïllat a la pell, al punt d'inserció del catèter, en els diferents segments del catèter o en els hemocultius és el mateix i, per tant, és la causa real de la infecció (120,151,152,153).

Una metaanàlisi realitzada sobre mètodes diagnòstics de sèpsies per catèter, demostra que el cultiu quantitatiu del catèter és el mètode més acurat pel que fa als diferents tipus de cultiu de catèter i que l'hemocultiu quantitatiu transcatèter és el tipus de cultiu més cost-efectiu (29).

### **1.6- Tipus d'infecció de catèter. Definicions.**

La definició inicial de la sèpsia per catèter, abans de la introducció de les tècniques de diagnòstic microbiològic, és la d'un episodi de sèpsia en el que no es pot identificar el focus i que es resol amb la retirada del catèter (36). Les definicions de les infeccions associades a catèter publicades pel CDC modificades són (154):

Entenem per **Colonització del catèter** la presència de 1 a 14 ufc en el cultiu semiquantitatiu de la punta del catèter o de menys de  $10^3$  ufc/mL en el cultiu quantitatiu en absència de signes d'infecció local o general.

Entenem per **infecció associada a catèter** la presència de més de 15 ufc en el cultiu semiquantitatiu o més de  $10^3$  ufc/mL en el cultiu quantitatiu (rentat endoluminal) de la punta del catèter, que és responsable d'una infecció general o local.

\* Les **infeccions generals** associades a catèter que es poden presentar són:

**a) Bacterièmia/ fungèmia associada al catèter.** Aïllament d'un microorganisme en els hemocultius extrets per venes perifèriques i presència de 15 o més ufc en el cultiu semiquantitatiu o més de  $10^3$  ufc/mL en el cultiu quantitatiu del segment distal del catèter del mateix microorganisme. En cas que no es retiri el catèter, considerarem que una bacterièmia està associada a



una infecció del catèter si s'observa un recompte diferencial de quatre o més vegades del número de colònies per mililitre entre la sang obtinguda a través del catèter sospitós de ser la font d'infecció respecte de la sang obtinguda per venopunció perifèrica (71). En aquestes situacions cal a més que no es trobi ningun focus d'infecció associat que expliqui la bacterièmia/ fungèmia.

**b) Sèpsia associada a catèter.** Quan una bacterièmia/ fungèmia associada a catèter segons l'hem definida anteriorment, s'acompanya de resposta inflamatòria sistèmica.

\* La **infecció local** pot manifestar-se com:

- Infecció del punt d'inserció a la pell. Quan es presenta eritema, induració, dolor i exudat al punt d'externalització del catèter o al punt d'accés al reservori (155).
- Infecció del túnel de catèter. Quan hi ha induració, dolor i eritema iniciat almenys a un cm del punt d'inserció del catèter i que segueix el trajecte del catèter (155).
- Infecció del reservori del catèter. Quan hi ha induració, eritema i dolor al voltant del reservori amb cultiu positiu del material aspirat del reservori (155).

I, finalment, en les infeccions associades a catèter cal no oblidar les **flebitis**, importants per la seva freqüència, gravetat i les complicacions a les que poden donar lloc. Cal tenir present, però, que les flebitis relacionades amb el líquid d'infusió són sovint degudes a factors físicoquímics més que no pas a etiologia infecciosa (1).

### **1.7- Tractament.**

Tradicionalment, el tractament de la infecció de catèter ha estat la retirada del catèter com a font de la infecció (7,8,9). En la majoria de casos la retirada és suficient per a produir la desaparició de la febre i de la resta de signes de la infecció (9).

No obstant, una vegada retirat el catèter per sospita d'infecció, el cultiu pot donar un resultat negatiu en el 75-85% dels casos i, per tant, torna

innecessari aquest procediment (15,36). A més a més, té com a inconvenients que el pacient necessita sovint el manteniment d'un accés vascular, la dificultat d'inserir-ne un de nou i el cost econòmic que tot això suposa.

Actualment, s'ha demostrat que aquesta infecció es pot tractar sense la retirada del catèter si es compleixen certes condicions clíniques (53). Pels catèters perifèrics es recomana la seva retirada ja que això no suposa pel pacient un risc major que el que pot suposar la infecció. Però no és així en el cas dels catèters tunelitzats o amb reservori subcutani, per les complicacions tècniques de la seva retirada i les de la implantació d'un nou catèter en pacients ja amb un estat clínic força deteriorat (151). A més, en estudis anteriors ja es va comprovar que, tot i en pacients immunodeprimits, l'administració d'antibiòtics per via sistèmica durant varies setmanes, a través del catèter infectat o per un altre de diferent aconsegueix tractar la sèpsia, sense que calgui la retirada sistemàtica del catèter infectat. A més, aquest tractament permet perllongar el temps d'ús del catèter (156,157,158,159).

Segons l'establert a la Conferència de Consens de les UCI, actualment es recomana la retirada dels catèters infectats només en les següents situacions (160):

- 1- catèters que fàcilment es poden reemplaçar.
- 2- quan hi ha signes evidents d'infecció local (tunelitis o infecció a la porta d'entrada).
- 3- presència d'embolismes pulmonars o endocarditis (15).
- 4- infecció acompanyada de xoc sèptic o quadre clínic no controlat en 48-72h.

El tractament antibiòtic convencional de la infecció de catèter ha d'incloure de forma empírica la majoria de microorganismes potencialment causals d'aquesta infecció. Per això es recomana la cobertura àmplia de microorganismes gram positius i gram negatius que poden ser, com s'ha indicat, causa de la infecció (taula 1.3). Malgrat que el tractament empíric pot variar en cada hospital d'acord amb la taxa de resistència a la meticilina i a l'espectre de bacils gram negatius causants de sèpsia, d'entre els antibiòtics que es poden administrar en aquestes infeccions hi ha les penicilines resistents a la penicilinasa com la cloxacilina; dels glicopèptids, la vancomicina o la teicoplanina; els aminoglicòsids, com la gentamicina i

l'amikacina; l'aztreonam i de les quinolones, la ciprofloxacina que és del que se'n té més experiència (9).

Si en lloc de tractar la infecció de forma empírica amb un únic antibiòtic, s'opta per tractar la infecció amb una associació d'antibiòtics, la d'un glicopèptid més un aminoglicòsid (42,70) o bé, més aztreonam (9) és la més emprada. Altres combinacions antibiòtiques són la de cloxacilina amb un aminoglicòsid o bé, si la taxa de resistències ho permet, la ciprofloxacina en règim de monoteràpia. Una vegada documentada la infecció, el tractament antibiòtic haurà d'adaptar-se al microorganisme responsable i el seu antibiograma.

Quan es combina el tractament antibiòtic empíric amb la retirada del catèter i en cas que el pacient no sigui portador d'un altre cos estrany es recomana l'administració de cloxacilina 200 mg/ kg/ dia associada a gentamicina 4,5 mg/ kg/ dia. Quan la sèpsia per catèter es presenta en malalts portadors de d'altres cossos estranys es recomana l'administració empírica de vancomicina 1 g/ 12 h amb o sense gentamicina 4,5 mg/ kg/ dia (15).

La durada de les pautes del tractament sistèmic depèn de la intensitat de la bacterièmia inicial, de la condició clínica del pacient, de la possibilitat de complicacions amb infeccions metastàsiques i del microorganisme responsable (9, 15). Una bacterièmia aïllada per *S. epidermidis* no requereix tractament antibiòtic donat que sol ser autolimitada. Tot i així, aquest microorganisme s'adhereix molt fàcilment als cossos estranys presents a l'organisme, la qual cosa fa imprescindible el seu tractament si aquests existeixen (15). Es recomana tractament amb vancomicina sistèmica durant 5-7 dies si es produeix la defervescència en 48-72 h. En cas que simultàniament es retiri el catèter, el tractament podrà ser més curt (94).

Inicialment, l'article de revisió presentat per Jernigan i col.laboradors (161) de la bacterièmia per *S. aureus* recomanava l'any 1957 una durada de l'antibioteràpia sistèmica d'entre 4 i 6 setmanes, per l'elevada prevalença de casos d'endocarditis per *S. aureus* i que pot arribar a complicar fins l'1% dels casos de bacterièmia. Altres sèries posteriors, consideren un baix índex de complicacions (162,163,164,165) i proposen tandes antibiòtiques de curta

durada (2 setmanes), tot i que això fa que l'índex d'aparició de complicacions tardanes sigui fins del 6%.

En el cas de sèpsia per bacils gram positius, l'antibiòtic d'elecció és la vancomicina (2).

En cas que s'aïllin llevats, els antifúngics recomanats són l'anfotericina B a dosi de 0,5-1 mg/ Kg/ dia, amb una dosi màxima acumulativa de 300-500 mg (15) i el fluconazol a dosi de 200-400 mg/dia (9). Si el pacient està greu i l'agent aïllat és *C. albicans* s'haurà de retirar el catèter, tot i que alguns autors no consideren la retirada sempre necessària (12), i iniciar tractament via sistèmica amb anfotericina B (15). El tractament sistèmic amb anfotericina B convencional es demostra més efectiu que l'anfotericina B liposomal, ja que es necessita incrementar les concentracions administrades per a igualar-ne els resultats (166).

En conjunt, es pot considerar que el tractament antibiòtic pot ser de mitjana de 7 a 10 dies excepte en el cas de *S. aureus*, *E. faecalis* i llevats en què el tractament ha de ser d'un mínim de 15 dies (13).

Una altra línia de tractament sistèmic inclou l'associació al tractament antibiòtic d'un tractament fibrinolític local amb activadors del plasminogen com l'estreptoquinassa o l'uroquinassa. Això pretén la dissolució del coàgul als catèters ocluíts. Dosis baixes de l'ordre de 2.500 U d'uroquinassa i 10.000 U d'estreptoquinassa semblen ser suficients (167). Aquesta associació millora el rendiment en el tractament de les sèpsies que tenen mala resposta al tractament antibiòtic aïllat (70). Cal tenir present, però, que no es pot iniciar el tractament fibrinolític massa abans que el tractament antibiòtic ja que es produiria una disseminació massiva dels microorganismes del coàgul de fibrina cap al torrent circulatori.

Existeix un treball aleatoritzat, prospectiu i doble cec en què es compara un grup de malalts amb infecció per catèter tractats amb placebo i antibiòtics amb un grup tractat amb uroquinassa i antibiòtics. Els autors conclouen que la uroquinassa a la sèpsia per catèter no representa una milloria substancial en el número de catèters salvats ni en la rapidesa en la curació de la infecció.

Per contra, la utilització d'uroquinassa afavoria l'aparició de signes de sèpsia en els malalts del grup (168).

Una altra de les associacions del tractament antibiòtic sistèmic és amb heparina aplicada al catèter. No es troba una pèrdua del poder d'anticoagulació de l'heparina (169) ni que hi hagi un efecte en la supervivència dels microorganismes (170). Tot i això, queden dubtes sobre l'existència d'interaccions químiques i sobre l'eficàcia de la combinació amb antibiòtics "in vivo". Aquestes dades entren en contradicció amb alguns dels estudis publicats que troben que amb l'associació de vancomicina amb heparina es formen precipitats amb la consegüent pèrdua d'activitat de l'antibiòtic i risc d'embolització (171).

Per a evitar la trombosi dels catèters inserits, s'injecta heparina al catèter durant els períodes en què no s'usa per a evitar-ne la coagulació; aquesta estratègia es coneix amb el nom d'heparina-lock (172). De la mateixa manera, fa 10 anys (13,27) Messing i col.laboradors van proposar el tancament del catèter suposadament contaminat o infectat amb una solució d'antibiòtic específica (13). L'administració intermitent a l'interior del catèter (73) del tractament antibiòtic a altes concentracions de forma local per a garantir una exposició perllongada a l'antibiòtic es coneix amb el nom d'antibiòtic-lock (73,144,151). Algunes sèries troben un 92% de negativitzacions dels cultius amb aquesta tècnica aplicada a catèters centrals tipus Hickman independentment del tipus d'aïllament microbiològic (72). Els estudis de farmacocinètica de l'antimicrobià han demostrat que no s'afecta amb l'administració d'antibiòtic a altes concentracions a nivell local (173). Aquest fet és important per l'estret marge terapèutic que tenen antibiòtics com els glicopèptids i tampoc s'observa una modificació en l'estabilitat dels components.

Donat que aquesta forma de tractament amb altes concentracions d'antibiòtic durant un temps d'exposició elevat aconsegueix l'esterilització del catèter sense que calgui la seva retirada la fan, encara que calgui la seva optimització, una tècnica a considerar en els casos en què es vulgui conservar el catèter (151). Aquesta tècnica aporta els següents avantatges:

En ocasions, evita el tractament sistèmic i els seus efectes secundaris (10,23,27,139,173,174). Incrementa i manté la concentració local d'antibiòtic (13) de forma perllongada (73,151) ja que en estudis fets amb antibiòtics com gentamicina i vancomicina no s'observa disminució de la seva activitat (10). Aquest fet permet eliminar ràpidament els bacteris susceptibles (10) i evita l'aparició de microorganismes resistents durant el tractament (11).

En no veure's afectada la farmacocinètica de l'antibiòtic (173) i el fet que sovint no cal l'administració dels antibiòtics per via sistèmica, elimina la necessitat de monitoritzar els nivells plasmàtics d'antibiòtic (139).

A diferència de la perfusió continua d'antibiòtics i donat que el catèter està tancat, disminueix el risc de disseminació hematògena de microorganismes (9,139).

És més cost-efectiu ja que permet una disminució de l'estada hospitalària (23,27,73), fet que millora la qualitat de vida del pacient perquè, i en cas que sigui possible, permet que aquest acabi el tractament a domicili (27). Això és especialment important en pacients amb malalties de base greus que els limiten per a desenvolupar-se de forma normal i que necessiten ingressos hospitalaris freqüents (23,174).

També permet perllongar la durada dels catèters, ja que aconsegueix esterilitzar-los o incrementar el temps durant el qual estan lliures d'infecció (174).

La tècnica de l'antibiòtic-lock encara té, però, un conjunt de temes i qüestions per resoldre. D'entre elles es poden destacar:

Quin paper pot jugar l'heparina en el tractament local de la infecció per catèter?; quin és l'antibiòtic d'elecció per a tractar les infeccions del catèter en relació al microorganisme causal? (175); si l'administració local d'antibiòtic esterilitza només la superfície interna del catèter (10,175) o bé també l'externa; quines han de ser les concentracions a les que s'administra l'antibiòtic; i si durant el tractament es mantenen altes concentracions a l'interior del catèter. També cal saber si s'evitarà així l'aparició de resistències a l'antibiòtic per l'exposició mantinguda de nivells efectius d'antibiòtic.

Un altre dels punts importants és quina ha de ser la durada del tractament que oscila entre 5 a 8 dies (10,11,73,174) fins a dues setmanes (13,144), si aquest tractament ha d'anar associat a tractament sistèmic simultani/seqüencial o no quan hi ha bacterièmia acompanyant, tampoc no està ben definit (11,175,176). Hi ha estudis que no troben diferències en si es fa o no l'antibiòtic-lock després d'un tractament sistèmic, tot i que la metodologia de realització de l'estudi pot haver influenciat la distribució dels malalts en els grups de tractament i, per tant, els resultats (176). En cas de malalts en hemodiàlisi, aplicant vancomicina o ciprofloxacina a 100 µg/mL en heparina al 5% després de cada sessió d'hemodiàlisi durant 15 dies s'ha demostrat que s'aconsegueix curar les infeccions per catèter (144).

El paper de l'associació amb anticoagulant (2) també és encara discutit ja que hi ha sèries que troben que l'associació a certs antibiòtics dona més bons resultats que l'antibiòtic sol mentre que altres els troben pitjors, potser per la formació de precipitats que inactiven antibiòtics com la vancomicina (171). A més, no queda clar si l'associació a algun tipus d'anticoagulant pot produir o no una disminució de l'activitat de l'antimicrobià (151).

### **1.8- Models experimentals.**

És doncs per l'elevada incidència d'aquesta infecció, el volum dels recursos sanitaris que consumeixen els pacients afectes d'aquesta patologia, i els dubtes encara existents quant al tractament mitjançant la tècnica de l'antibiòtic-lock pel que s'han desenvolupat diversos models "in vitro" i "in vivo". Es presenta aquest treball que pretén ajudar a resoldre algunes de les qüestions plantejades anteriorment.

Veiem abans, però, algunes de les característiques dels models desenvolupats fins el moment:

#### **1.8.1- "In vitro". Models amb botelles.**

Els models experimentals “in vitro” sobre la infecció per catèter s’han centrat en l’estudi de l’adherència dels microorganismes a superfícies plàstiques, per avaluar el risc d’infecció de certs models o tipus de catèter o bé investigar aspectes terapèutics i de prevenció.

Els inconvenients fonamentals d’aquests models són: el fet que usen segments de catèter i no catèters complets; són models estàtics, que no tenen en compte la influència del medi intern ni del flux circulatori en la patogènia de la infecció, i no inclouen la connexió, com hem vist factor clau en les infeccions per catèter (177).

Dels models existents, el proposat per José Luis Pérez, que incorpora catèters complets, dels quals hi ha un segment que es troba a temperatura corporal, així com la presència al segment distal d’un coàgul de fibrina artificial suposa una milloria real a aquests models (178).

Pel que fa als models “in vitro” desenvolupats per a l’estudi del tractament de la sèpsia per catèter ja al 1994 Pascual i col.laboradors troben que l’associació d’amikacina o rifampicina als glicopèptids té capacitat d’esterilitzar el catèter i quan els glicopèptids s’administren sols, és la teicoplanina la que dona més bons resultats per sobre de la vancomicina, tot i que cap dels dos aconsegueix esterilitzar el catèter. A més, aquests autors troben un efecte relacionat amb la composició del material del catèter, i són els de poliuretà els que permeten més bona activitat comparat amb els de polivinilclorat (179).

### **1.8.2- “In vivo”. Models animals.**

Hi ha dos fets rellevants en la història dels antibiòtics que poden establir el significat dels models animals d’infecció per a valorar l’eficàcia i la toxicitat d’un determinat antibiòtic. El primer va ser la troballa que Prontosil, una sulfamida, protegia els ratolins de la infecció per *S. pneumoniae* (180). Posteriorment, Chain i col.laboradors van demostrar, també en ratolins, que la penicil.lina era eficaç en el tractament de les infeccions sistèmiques per cocs gram positius. El fet que tant sulfamides com penicil.lina fossin eficaces i no



tòxiques en el tractament de les infeccions en humans va ser corroborat en estudis clínics posteriors (181).

Els models animals d'infecció fan de pont d'unió entre els estudis de caracterització d'un antibiòtic "in vitro" i en clínica humana. Permeten l'avaluació i el desenvolupament de nous fàrmacs tant en la seva vessant farmacocinètica com toxicològica o d'eficàcia terapèutica. A més, l'ús de certs models pot permetre el millor coneixement de la fisiopatologia de les infeccions així com la definició de noves pautes d'eficàcia terapèutica.

Qualsevol nova substància que demostrï un cert efecte "in vitro" ha de ser sotmesa a un model animal per a valorar la seva possible eficàcia terapèutica. En el cas dels antibiòtics i els models animals, aquests sotmeten a la molècula a una sèrie de condicions (tant mecanismes de defensa de l'hoste com processos metabòlics) que poden alterar l'activitat antimicrobiana demostrada "in vitro".

En qualsevol cas, les troballes dels models experimentals poden predir els resultats de l'activitat en humans. Tot i això, l'aparició de noves molècules i nous models animals permet afirmar que quant major és l'experiència i el nombre de dades obtingudes, els resultats dels models són menys extrapolables als humans. Això ho demostra l'estudi fet per Zak i Sande que després de comparar els resultats dels estudis "in vitro" i en models animals en més de 2000 nous antimicrobians van comprovar que l'efecte antibacterià "in vitro" podia ser comprovat només en prop del 40 % dels casos. Per altra banda, en quatre casos molècules que no havien demostrat cap activitat "in vitro", si la van demostrar "in vivo" (182).

#### **1.8.2.1- Tipus de models animals.**

Des de mitjan segle passat s'han desenvolupat més de mil models animals diferents per a la investigació de malalties infeccioses. Depenent del seu objectiu, natura i poder predictiu poden dividir-se en diferents categories: **models bàsics d'escrining antimicrobià, monoparamètrics, ex-vivo i discriminatius**. D'aquests els tres primers són molt bàsics i estan dissenyats

per a demostrar un determinat efecte antibiòtic així com per a valorar la seva toxicitat i farmacocinètica (183).

**\* Models bàsics d'escrining antimicrobià.**

Aquest tipus de model satisfà els requeriments bàsics d'O'Grady per a l'avaluació inicial d'un antimicrobià "in vivo": tècnica d'infecció i tractament senzill, curta durada de l'experiment (per a disminuir les influències ambientals), evolució de la infecció i resultats reproduïbles i fàcil avaluació dels resultats, preferiblement amb un únic paràmetre a analitzar del tipus "tot o res" (184).

El més usat d'aquests models és el de la sèpsia en ratolins (185) i també el d'infecció en cuixa de rata-ratolí (186). En aquests models la infecció és induïda per un inòcul que garanteix la mort (o inflamació de l'orga -per exemple, la cuixa-) de tots els animals que posteriorment són tractats amb una pauta estàndard que s'inicia en el moment de la infecció o molt aviat després de ser instaurada. Aquests models no poden valorar de manera adient l'eficàcia terapèutica dels antibiòtics, ja que actuen de manera diferent a com es produeixen les infeccions en humans. A la pràctica clínica, els antibiòtics són administrats per a combatre les infeccions totalment establertes i originades, en la majoria dels casos, per un inòcul baix. Els paràmetres utilitzats per a valorar o comparar l'eficàcia són: l'habilitat de les diferents dosis d'antibiòtic de protegir o perllongar la vida (o disminuir la inflamació de l'orga-la cuixa)- percentatge de supervivència- i la dosi que protegeix de la mort al 50% dels animals (o que inhibeix la inflamació de l'orga -la cuixa-).

Aquests models s'usen per a l'avaluació inicial d'un antibiòtic donat. Tenen com a avantatges que les tècniques d'infecció i de tractament són molt senzilles i econòmiques, els paràmetres d'avaluació final són molt simples i l'administració per diferents vies (oral-parenteral) dóna una idea de la seva capacitat per a arribar als focus d'infecció distants del punt d'inoculació.

A més, en aquests models cal tenir present que la rellevància dels resultats està lligada a les limitacions inherents al model que el diferencien clarament del que s'esdevé en humans (187,188,189). D'entre elles:

a) L'evolució invariablement fatal. La ràpida difusió dels bacteris en hores des del focus de la infecció (p.e. la cavitat peritoneal) fins gairebé tots els òrgans amb uns recomptes que poden ser de l'ordre de  $10^7$  ufc/mL no és característic de les infeccions en humans.

b) El curs fulminant, ja que els antibiòtics són administrats en el moment de la infecció i els mecanismes de defensa de l'organisme apareixen sota la influència de l'antibiòtic amb la qual cosa els seus efectes són més profilàctics que terapèutics.

c) Els resultats depenen en gran manera de l'inòcul infectant. Un augment de 1-2 log ufc pot fer que un antibiòtic sigui ineficaç. Per exemple, cefamandol es converteix en un antibiòtic ineficaç en ratolins amb septicèmia per *E. coli* productor de beta-lactamasa si s'augmenta l'inòcul infectant de 5,3 a 7,3 log ufc/mL. Una disminució semblant transforma a Penicil·lina G oral en un tractament eficaç per a infeccions estafilocòciques en ratolins.

d) Les diferències farmacocinètiques i de metabolisme entre els ratolins i l'home afecten l'evolució de la infecció i poden dificultar l'extrapolació de resultats. Per exemple, el percentatge d'unió a proteïnes plasmàtiques de cefazolina és del 14% a ratolins i del 85 % a l'home. Els antibiòtics amb una vida mitjana d'eliminació molt curta als ratolins, com els betalactàmics ( $t_{1/2}$ = 5 minuts) poden ser molt més eficaços a l'home on la vida mitjana pot ser major o igual a una hora.

e) Quan s'usen ratolins s'ha de realitzar una acurada estandardització dels animals, donat que la soca dels ratolins (fins i tot el proveïdor), l'edat o el sexe, poden afectar el grau de susceptibilitat a la infecció i, en definitiva, a l'eficàcia de l'antibiòtic administrat.

Malgrat aquestes cinc limitacions comentades els models bàsics d'escrining donen una informació molt vàlida respecte de l'eficàcia, toxicitat i vies d'administració més òptimes. Amb els resultats d'aquests estudis es prenen moltes decisions sobre la viabilitat d'un antibiòtic concret.

\* **Models monoparamètrics.**

Són aquells en què s'estudia un únic paràmetre per a valorar l'eficàcia antibiòtica. Aquest paràmetre pot ser, per exemple, el recompte bacterià o bé la concentració d'antibiòtic als teixits.

Són semblants als anteriors i s'usen a fases més avançades de la investigació. S'apliquen per a obtenir informació sobre qüestions que per raons tècniques o ètiques serien impossibles de contestar en humans com, per exemple, l'efecte de concentracions subinhibitòries d'antibiòtics o el de tractaments curts.

**\* Models "ex-vivo".**

Aquests models utilitzen un cos estrany, generalment implantat en el teixit subcutani o peritoneu, que és infectat abans o després de la seva implantació. Alguns d'aquests models s'han usat exclusivament per a estudis farmacocinètics mentre que altres, com el model del cos estrany subcutani, s'ha utilitzat també per a valorar l'eficàcia d'antibiòtics on, després d'un temps variable, s'inicia el tractament de la infecció ja establerta.

Els diferents models "ex-vivo" permeten avaluar la capacitat de difusió de determinats antibiòtics en infeccions capsulades, el percentatge de letalitat bacteriana, els efectes dels antibiòtics sobre la fisiologia i la morfologia bacteriana, i la selecció de resistències durant el tractament antibiòtic.

La valoració de l'eficàcia del tractament es basa en diferents paràmetres com la concentració d'antibiòtic en l'exudat, la densitat antibiòtica del biofilm que recobreix el cos estrany o el mateix exudat, segons el model del que es tracti. Molts dels inconvenients comentats en els models d'escrining bàsic poden ser aplicats a aquests models sobretot si s'usen rossegadors petits.

**\* Models discriminatius.**

Els **models discriminatius** estan ideats per a que s'assemblin el màxim a la infecció tal i com es produeix en humans (per exemple: endocarditis i

osteomielitis en conills i rates o meningitis en conills). Els models discriminatius tenen una sèrie d'avantatges pràctics i científics sobre els estudis clínics que els fa molt recomanables per a l'avaluació de noves pautes terapèutiques. Variables com l'estadi de la malaltia, la severitat de les complicacions, l'heterogenicitat de la població i la farmacocinètica que són complexes i podrien confondre els resultats dels estudis clínics per la seva gran variabilitat, poden mantenir-se de manera constant i inalterable en els estudis en el model animal. Així els paràmetres que ens donaran els resultats són molt concrets i, per tant, fàcils de comparar estadísticament. A la vegada, els resultats són reproduïbles fet que els dona més validesa. En darrer lloc, es poden usar tants animals com calgui per a contestar les qüestions comentades, cosa impossible de plantejar en malalties tant poc freqüents com l'endocarditis o la meningitis. En darrer lloc, aquests models han permès contestar preguntes de tant difícil resposta en clínica com la importància de l'efecte antibiòtic bactericida versus el bacteriostàtic, el poder bactericida del sèrum com a factor predictiu, quina és la dosi mínima eficaç o l'interval de dosificació més favorable d'un antibiòtic, entre d'altres.

En general, podem dir que les característiques del model animal ideal són (182,183,190): que la tècnica de la infecció sigui fàcil, que el microorganisme causal, la porta d'entrada, la via de disseminació de la infecció i el grau d'afectació tisular siguin idèntics o bastant similars a la situació en humans; que la severitat, l'evolució de la malaltia i la seva durada siguin reproduïbles i fàcils d'analitzar; i finalment, que l'eficàcia del tractament sigui fàcilment mesurable i reproduïble i l'animal utilitzat el més barat possible.

Malgrat tots aquests avantatges, l'extrapolació dels resultats a humans ha de fer-se amb cautela. Per a evitar al màxim els errors cal tenir en compte les següents consideracions:

- 1.- La infecció ha de mimetitzar el màxim el que esdevé en humans, fonamentalment el que es refereix a l'inòcul que la indueix, a la resposta de l'hoste i a l'evolució de la malaltia.
- 2.- En estudis d'eficàcia terapèutica, ha d'existir una comparació amb les pautes de tractament reconegudes com a estàndard de demostrada eficàcia clínica.

### **1.8.2.2- Aspectes ètics i legislatius.**

Entre els investigadors que fan ús de l'animal de laboratori existeix un codi de conducta que queda ben reflexat en les Normes publicades per l'Acadèmia Suïssa de les Ciències Mèdiques i l'Acadèmia Suïssa de les Ciències. Aquests principis, que poden ser el fonament de les diferents normes i regles de nivell més concret són (191):

1. No realitzar experiments sense necessitat. Tot experiment ha d'estar precedit d'una deliberació acurada.
2. Ningún animal ha de sofrir innecessàriament.
3. Si el dolor és inevitable, ha de ser totalment justificat per al coneixement que se n'adquirirà amb els experiments.
4. Cada investigador assumeix completament la responsabilitat de les seves accions.

Un altre dels principis bàsics en experimentació animal es basa en la regla de les tres erres de Russell i Birch (192): reduir, reemplaçar i refinar. Això és, reduir al màxim el número d'animals utilitzats, reemplaçar en la mesura del possible el número d'animals per tècniques experimentals "in vitro" i refinar la tècnica al màxim per a reduir el sofriment animal.

La legislació sobre l'ús i protecció dels animals utilitzats en experimentació i altres fins científics va ser elaborada pel Consell d'Europa el 1986 (193). Al nostre país, la investigació amb animals està legislada pel Reial Decret 223/1988 de 14 de Març de 1988 (194), per l'Ordre del 13 d'Octubre de 1989 (195) i pel Instrumento de Ratificación del Convenio Europeo (196) i, en concret, a la Comunitat Autònoma de Catalunya per la Llei 5/1995 de 21 de juny (197) i pel Decret 214/1997 de 30 de juliol (198) pel qual es regula la utilització d'animals per a experimentació i per a altres finalitats científiques.

A la Directiva del Consell d'Europa relativa a la protecció dels animals per a experimentació i altres fins científics, els estats membres estan d'acord en que: "... l'home té l'obligació moral de respectar tots els animals i de

considerar la seva capacitat de sofriment i de memòria. En les seves qüestions referents a coneixement científic i salut, l'home té la necessitat d'usar animals si existeix un supòsit raonable que els resultats seran beneficiosos per a l'home...". Per altra banda es considera que la Directiva del Consell d'Europa "té com objecte harmonitzar la legislació dels diferents estats membres de la CEE pel que fa a la protecció dels animals usats per a aquests fins, garantint al mateix temps que el nombre d'animals usats en aquests tipus de pràctiques es redueixi al màxim i que, en tot cas, se'ls concedeixi un tracte que eviti al màxim el dolor, el sofriment, l'estrès o la lesió perllongada innecessàriament i de manera que es fomenti la posta a punt de tècniques alternatives que puguin aportar el mateix nivell d'informació que l'obtingut amb experiments amb animals i que suposin una menor utilització d'aquests (193).

## **II- HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS.**

### **2.1- Hipòtesi de treball.**

Hem treballat amb la següent hipòtesi:

**L'antibiòtic-lock és un mètode útil pel tractament local de la infecció de catèter.**

### **2.2- Objectius.**

El treball té els objectius detallats a continuació:

**1.- Estandarditzar un model experimental de bacterièmia associada a catèter per *S. aureus* meticilin-sensible que permeti valorar diverses pautes de tractament sense la retirada del catèter.**

**2.- Avaluat la utilitat de l'heparina en el tractament antibiòtic local de la infecció de catèter.**

**3.- Avaluat l'eficàcia de diferents pautes antibiòtiques en el tractament local de la infecció de catèter.**



### III- MATERIAL I MÈTODES.

#### 3.0- Microorganisme.

Per a l'estudi "in vitro" es van utilitzar 12 soques de *S. aureus* obtingudes d'hemocultius de pacients amb sèpsia per catèter ingressats als hospitals de la Vall d'Hebron de Barcelona.

Per a l'estudi del model animal es van usar les dues soques de *S. aureus* que van mantenir un comportament més homogeni en els experiments d'estandardització del model.

#### Proves d'identificació.

A totes les soques de l'estudi se'ls va reconfirmar la identificació de gènere i espècie mitjançant la prova de la coagulassa en tub amb plasma citratat de conill, la prova de la DNAssa i una prova d'aglutinació en porta (Staphy-slide®).

#### Mètode d'emmagatzematge.

Per a preparar l'emmagatzematge es van inocular 6-7 colònies de cada una de les soques en MHB i es van incubar durant 8 h a 37° C en aire ambient. Posteriorment, van ser sembrades en plaques de MHS i incubades durant 18-20 h a 37° C en aire ambient. Després 100-150 colònies van ser resuspeses en aliquotes d'un mL de medi Skim-milk i congelades a -80° C.

### **3.1- Estudis “in vitro” per avaluar l’activitat de diverses pautes antibiòtiques de tractament de les infeccions de catèter per *S. aureus*.**

#### **3.1.1- CIM i CBM d’ heparina i antibiòtics.**

La CIM i la CBM dels antibiòtics provats en les soques de l’estudi es van fer per macrodilució segons les normes de la NCCLS (199, 200). Per a la determinació de la CIM i la CBM d’heparina es va seguir la mateixa metodologia.

Els inòculs es van preparar de cultius en fase de creixement exponencial per aconseguir una concentració final de  $10^5$  ufc/mL. El medi d’estudi de la sensibilitat va ser el Brou de Mueller Hinton amb cations ajustats.

En el cas de la determinació de la CIM d’heparina, les soques en estudi es van inocular en dilucions seriades d’heparina amb un interval final de concentracions de 1000-6000 UI/mL. En el cas de la determinació de la CIM dels antibiòtics es van inocular en dilucions dobles progressives de vancomicina i de ciprofloxacina (interval final: 0,06-32  $\mu$ g/mL) i de rifampicina (interval final: 0,0002-128  $\mu$ g/mL) en MHB.

Es va utilitzar com a soca control la soca *S. aureus* ATCC 29213. Per a confirmar la puresa i determinar la concentració de l’inòcul es van utilitzar subcultius. Els tubs que contenien l’inòcul bacterià en dilucions d’heparina, vancomicina, ciprofloxacina i rifampicina van ser incubats durant 24 h a 37° C en aire ambient.

Pels estudis d’antibiòtics la CIM va ser considerada com la concentració més baixa d’antibiòtic que inhibia el creixement visible del microorganisme en estudi (199).

La CBM es va determinar mitjançant els subcultius quantitius en MHS de 100  $\mu$ L del tub amb la concentració d’antibiòtic més alta que presentava creixement visible i de tots els tubs sense creixement visible. Les plaques es van incubar durant 48 h a 37° C en aire ambient. La CBM es va considerar

com la menor concentració d'antibiòtic que produïa una reducció de l'inòcul inicial major o igual a 99,9% (200).

Es va definir CIM<sub>50</sub> com la concentració d'antibiòtic capaç d'inhibir el creixement visible del 50% de les soques de l'estudi i CIM<sub>90</sub> com la concentració d'antibiòtic capaç d'inhibir el creixement visible del 90% de les soques de l'estudi.

Es va definir CBM<sub>50</sub> com la concentració d'antibiòtic que va resultar bactericida pel 50% de les soques de l'estudi i la CBM<sub>90</sub> com la concentració d'antibiòtic que va resultar bactericida pel 90% de les soques de l'estudi.

Per a l'estudi de l'heparina es van considerar les mateixes definicions anteriors.

Totes les determinacions es van fer per triplicat.

Es descriu tot seguit el procés de preparació de l'inòcul, comú per a les determinacions de CIM:

#### **Preparació de l'inòcul.-**

a. Es va descongelar una alíquota del cultiu d'emmagatzematge dels microorganismes a estudiar. Es van subcultivar 50 µL per duplicat en MHS a 37° C durant 18-20 h en aire ambient.

b. De la placa de MHS, es van aïllar 5-7 colònies ben diferenciades i es van inocular en 5 mL de MHB precalentat a 37° C. Es van incubar a 37° C durant 2 a 4 h fins aconseguir que el cultiu tingués una terbolesa equivalent al patró nº 0,5 de l'escala de McFarland (Bacto McFarland Barium Sulfate Standards® Difco S.A.). Amb aquesta terbolesa l'inòcul aproximat va ser de 10<sup>8</sup> ufc/mL en fase de creixement exponencial.

c. Es van preparar 6 mL d'una dilució 1/1000 de l'inòcul en MHB ajustat al patró nº 0,5 de l'escala de McFarland, de la manera següent:

$$0,2 \text{ mL } (10^8 \text{ ufc/mL}) + 1,8 \text{ mL MHB} = 2 \text{ mL } (10^7 \text{ ufc/mL})$$

$$0,2 \text{ mL } (10^7 \text{ ufc/mL}) + 1,8 \text{ mL MHB} = 2 \text{ mL } (10^6 \text{ ufc/mL})$$

$$0,6 \text{ mL } (10^6 \text{ ufc/mL}) + 5,4 \text{ mL MHB} = 6 \text{ mL } (10^5 \text{ ufc/mL})$$

#### **CIM i CBM d'heparina.**

**Concentració Inhibitòria Mínima.**

El volum que es va preparar depenia del número de soques a estudiar, variable segons l'experiment.

**\* Preparació de les dilucions seriades d'heparina.-**

a. Es van marcar nou tubs estèrils de vidre de 16x100 mm amb tap metàl·lic.

b. Es van preparar 8 mL d'una solució mare d'heparina en sèrum fisiològic estèril a una concentració de 12000 UI/mL, segons la fórmula indicada a la pàgina 53, per la preparació de la solució mare dels antibiòtics. L'heparina va ser subministrada per la Sociedad Española de Especialidades Farmaco-terapéuticas S.A. (Barcelona, España).

c. Amb pipeta calibrada es van preparar dilucions seriades d'heparina en MHB al doble de la concentració final desitjada, segons l'esquema detallat a continuació:

1. Preparar H 12000 UI/mL
2. H 10000 UI/mL = 1,7 mL 1. + 0,3 mL MHB
3. H 9000 UI/mL = 1,5 mL 1. + 0,5 mL MHB
4. H 8000 UI/mL = 1,3 mL 1. + 0,7 mL MHB
5. H 6000 UI/mL = 1 mL 1. + 1 mL MHB
6. H 5000 UI/mL = 0,83 mL 1. + 1,17 mL MHB
7. H 4000 UI/mL = 0,7 mL 1. + 1,3 mL MHB
8. H 3000 UI/mL = 0,5 mL 1. + 1,5 mL MHB
9. H 2000 UI/mL = 0,3 mL 1. + 1,7 mL MHB

d. Es van marcar 9 tubs estèrils de vidre de 13x100 mm per a cadascuna de les soques que es van estudiar amb les concentracions d'heparina de cada tub. Es van dispensar 0,5 mL de cada dilució d'heparina a cadascun dels tubs.

e. Es van utilitzar dos tubs més, un com a control de creixement i un altre amb 1 mL de MHB com a control d'esterilitat del medi.

I finalment,

- f. Es van dispensar mitjançant pipeta calibrada 0,5 mL de l'inòcul diluït ( $10^5$  ufc/mL) en cadascun dels 9 tubs que contenien les dilucions seriadades d'heparina i en el tub de control de creixement.
- g. La concentració final de l'inòcul va ser de  $10^5$  ufc/mL ja que es va realitzar una dilució  $\frac{1}{2}$  de l'inòcul preparat.
- h. Es van incubar els tubs resultants a  $37^\circ$  C durant 24 h en aire ambient.
- i. A més, per a comprovar la puresa i la concentració de l'inòcul, es van fer dilucions decimals fins 1/100 del tub de l'inòcul de la manera següent:
- $0,2 \text{ mL } (10^5 \text{ ufc/mL}) + 1,8 \text{ mL MHB} = 2 \text{ mL } (10^4 \text{ ufc/mL})$   
 $0,2 \text{ mL } (10^4 \text{ ufc/mL}) + 1,8 \text{ mL MHB} = 2 \text{ mL } (10^3 \text{ ufc/mL})$   
 $0,2 \text{ mL } (10^3 \text{ ufc/mL}) + 1,8 \text{ mL MHB} = 2 \text{ mL } (10^2 \text{ ufc/mL})$
- Es van inocular 100  $\mu$ L d'aquesta suspensió en MHS. Es van estendre per la superfície de la placa usant una nansa estèril. Es van incubar aquestes plaques a  $37^\circ$  C durant 24 h en aire ambient.
- j. A les 20 h d'incubació, es van agitar els tubs sense creixement visible amb un agitador durant 15" i es van reincubar durant 4 h més.
- k. Es van llegir els resultats d'inhibició macroscòpica i es van registrar en un full de resultats.

Tots els experiments es van realitzar per triplicat.

Donats els resultats obtinguts de la determinació de la CIM en fase de creixement exponencial, no es va fer la determinació de la CBM d'heparina.

### **CIM i CBM de vancomicina, ciprofloxacina i rifampicina.**

#### **\* Preparació de les solucions mare dels antibiòtics.-**

La solució mare va ser preparada a partir de substància pura valorada de vancomicina (Dista S.A.), ciprofloxacina (Bayer S.A.) i rifampicina (Sigma Chemical CO).

Es van preparar solucions per emmagatzemar de vancomicina (potència 919  $\mu$ g/mg), de ciprofloxacina (potència 856  $\mu$ g/mg) i de rifampicina (potència 950  $\mu$ g/mg) en aliquotes d'1 mL a una concentració de 1000  $\mu$ g/mL. Com a solvent es va usar aigua destil.lada en el cas de la vancomicina i la ciprofloxacina i

metanol en el cas de la rifampicina per a aconseguir la concentració indicada segons la fórmula següent (201):

$$\text{Volum de solvent (mL)} = \frac{\text{pes substància pura (mg)} \times \text{potència de l'antibiòtic } (\mu\text{g/mg})}{\text{concentració desitjada } (\mu\text{g/mL})}$$

Una vegada preparades les solucions dels tres antibiòtics es van al·liquotar i es van congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Per a les determinacions de la sensibilitat de vancomicina dels bacteris en biocapa la concentració de les solucions mare va ser de  $2000 \mu\text{g/mL}$ .

### **Concentració Inhibitòria Mínima.**

#### **\* Preparació de les dilucions d'antibiòtic.-**

- a. Es va descongelar una al·liquota de solució mare de vancomicina, de ciprofloxacina o rifampicina. Com a diluent per a vancomicina, ciprofloxacina i rifampicina es va utilitzar aigua destil·lada.
- b. Es van marcar 20 tubs estèrils de vidre de  $16 \times 100$  mm amb tap metàl·lic.
- c. A partir de la solució mare, i segons la fórmula a baix indicada, es va preparar amb MHB un volum final de 8 mL a una concentració doble de la màxima de l'interval per a cada antibiòtic. Aquest va ser el tub que vàrem denominar n° 1.

$$C_{s.m.} (1000 \mu\text{g/mL}) \times V_{s.m.} = C_{s.f.} (256 \mu\text{g/mL}) \times V_{s.f.}$$

C: concentració

V: volum

s.m.: solució mare

s.f.: solució final

- d. Es van afegir 4 mL de MHB dels tubs n° 2 al n° 20.
- e. Es van transferir 4 mL del tub n° 1 al n° 2 i es van agitar. Es van canviar la punta de la pipeta i es va repetir el procediment fins al tub n° 20.

Així, l'interval de concentracions d'antibiòtic va ser el següent:

TUB (nº)	Concentració d'antibiòtic (µg/mL)
1	256
2	128
3	64
4	32
5	16
6	8
7	4
8	2
9	1
10	0,5
11	0,25
12	0,12
13	0,06
14	0,03
15	0,015
16	0,008
17	0,004
18	0,002
19	0,001
20	0,0005

- f. Per a cada soca i per a cada antibiòtic es van marcar 20 tubs estèrils de vidre de 13x100 mm amb tap metàl·lic amb la concentració final d'antibiòtic, meitat de l'interval de concentracions assenyalat. Es van transferir 0,5 mL dels tubs on s'havien preparat les concentracions inicials als nous tubs.
- g. Es van utilitzar dos tubs més, un com a control de creixement i un altre amb 1 mL de MHB com a control d'esterilitat del medi.
- h. Es van transferir mitjançant pipeta calibrada 0,5 mL de l'inòcul diluït (de l'ordre de  $10^5$  ufc/mL), preparat segons les indicacions anteriors, a cadascun dels 20 tubs que contenien les dilucions seriades de l'antibiòtic i al tub control de creixement. El volum d'inòcul preparat per aquests experiments va ser de 12 mL. El volum final de cada tub va ser de 1 mL.
- i. Com a control de puresa i concentració de l'inòcul es va utilitzar el mateix a l'indicat a l'apartat i., pàgina 52.
- j. Es van incubar els tubs resultants a 37° C durant 24 h en aire ambient.
- k. A les 20 h d'incubació, es van agitar els tubs sense creixement visible amb un agitador durant 15" i es van reincubar durant 4 h més.
- l. Es van recollir les dades de CIM en un full de resultats.

Els procediments que s'han descrit es refereixen a les determinacions dels tres antibiòtics en estudi. L'interval final de concentracions de rifampicina va ser de 0,0002-128 µg/mL, però per a les determinacions de vancomicina i de ciprofloxacina l'interval final de les concentracions va ser de 0,06-32 µg/mL.

### **Concentració Bactericida Mínima.**

- a. Una vegada registrada la CIM es van agitar de nou els tubs en l'agitador. Es van inocular 100 µL de tots els tubs sense creixement i del tub amb la concentració més alta d'antibiòtic amb creixement en plaques de MHS. Aquest volum es va estendre sobre la placa mitjançant una nansa estèril. Es van incubar les plaques a 37° C en aire ambient durant 48 h.
- b. Es va comptar el número de colònies. La concentració que assolía una reducció de l'inòcul inicial major o igual al 99,9% es va registrar com a CBM en un full de resultats.

El control de qualitat de la tècnica de sensibilitat "in vitro" es va realitzar:

1. Amb la soca *S. aureus* ATCC 29213 com a control de referència en cada sessió de treball en les determinacions de la CIM de l'antibiòtic. Si la CIM de la soca control utilitzada (*S. aureus* ATCC 29213) estava fora de l'interval acceptat, es rebutjaven els resultats obtinguts.
2. Un tub de control de creixement en brou inoculat amb cadascuna de les soques utilitzades en cada sessió i sense heparina o antibiòtics.
3. Mitjançant el subcultiu quantitatiu de la dilució del cultiu d'estafilococ que es va inocular en els tubs amb les diferents concentracions d'heparina i d'antibiòtic.
4. Un tub de control d'esterilitat amb brou sense heparina, antibiòtics ni microorganismes.
5. I mitjançant la realització dels experiments per triplicat.



### **3.1.2- CIM i CBM de vancomicina, ciprofloxacina i rifampicina en front de bacteris en biocapes.**

Per a la determinació de la CIM i de la CBM dels antibiòtics en estudi front de bacteris formant biocapes, es va seguir el mètode proposat per Ramírez de Arellano i col.laboradors (117) .

Per a cada experiment es van preparar segments de catèter de 0,5 cm de longitud que es van introduir en un flascó amb MHB i es van autoclavar. Posteriorment, es van inocular amb la soca a estudiar i es van incubar durant 24 h a 37° C en aire ambient. Després d'aquest període, es van obtenir dos tipus de creixement: bacteris dispersos en el brou en fase estacionària de creixement o bacteris plactònics; i bacteris adherits a la superfície dels segments de catèter, que vàrem anomenar fase adherent o biocapa.

Es va determinar per separat la sensibilitat als antibiòtics d'aquests dos tipus de creixement bacterià. Això vol dir que es van preparar simultàniament dues bateries de tubs per a la determinació de la CIM en cada fase de creixement.

Per a la determinació de la CIM i de la CBM dels bacteris en fase estacionària es va adaptar la metodologia de la NCCLS pel mètode de la macrodilució, especificada anteriorment.

Per a la determinació de la CIM en fase adherent es van adaptar les indicacions de la NCCLS utilitzant com a inòcul segments de catèter amb biocapa bacteriana.

Per a la determinació de la CBM dels bacteris adherits en superfície plàstica es van resuspendre els catèters en MHB estèril i es van sonicar a 50 Hz durant 5 minuts per a desenganxar els bacteris i es van centrifugar a 3000 rpm durant 10 minuts dues vegades per a fer desaparèixer l'antibiòtic. Posteriorment, es va fer una sembra quantitativa de 100 µL a 37° C durant 48 h en plaques de MHS d'aquells tubs que no havien presentat creixement visible i d'aquells amb la concentració antibiòtica més alta que havia presentat creixement.

Es van considerar les mateixes definicions de CIM i CBM que en el cas dels estudis de sensibilitat en els que es van emprar bacteris en fase de creixement exponencial.

Es descriuen tot seguit els procediments realitzats per a la determinació de la CIM i de la CBM en fase estacionària i en fase adherent.-

### **Concentració Inhibitòria Mínima.**

#### **\* Preparació dels segments de catèter.-**

- a. Es van preparar segments de catèter de silicona de 0,5 cm de longitud (SILASTIC<sup>®</sup>, ID/OD: 0.45/0.77 A Dow Corning Corporation, MI, USA) i es van introduir en 30 mL de MHB en flascó de vidre.
- b. Per a cada experiment de CIM i CBM en biocapa es van preparar 60 segments de catèter. A continuació es van esterilitzar pel mètode d'autoclavat a 121° C durant 15 minuts.
- c. Es van deixar refredar a temperatura ambient i es van emmagatzemar a 4° C fins el dia de l'experiment.

#### **\* Preparació de l'inòcul.-**

- a. Es va descongelar una alíquota del cultiu d'emmagatzematge del microorganisme a estudiar. Es van subcultivar 50 µL per duplicat en MHS a 37° C durant 18-20 h en aire ambient.
- b. El flascó de vidre estèril amb els segments de catèter en MHB, que prèviament s'havia deixat atemperar, es va inocular amb 5-7 colònies de la soca a estudiar. Es va incubar en estufa a 37° C durant 24 h en aire ambient.
- c. Passat aquest temps, es va procedir al processat per separat de les dues fases.

Es va separar la fase estacionària de la fase adherent decantant l'inòcul de la fase líquida en tub estèril de vidre de 16x100 mm amb tap metàl·lic i els segments de catèter en una placa de Petri estèril.

**\* Preparació de les dilucions d'antibiòtic.-**

A partir de les solucions mare, es van preparar dilucions de vancomicina, ciprofloxacina i rifampicina amb MHB el mateix dia d'ús, com s'ha explicat anteriorment a l'apartat 3.1.1., pàgina 53.

Els intervals de concentracions estudiats per a cada antibiòtic s'indiquen a la taula adjunta:

	Interval de concentracions ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	Fase estacionària	Fase adherent
<b>Vancomicina</b>	<b>0,12-512</b>	<b>0,25-1024</b>
<b>Ciprofloxacina</b>	<b>0,12-128</b>	<b>0,25-256</b>
<b>Rifampicina</b>	<b>0,0001-128</b>	<b>0,0002-256</b>

**\* Processament de la CIM en fase estacionària.-**

Els procediments van ser els mateixos que els indicats anteriorment per a la determinació de la CIM, però amb un inòcul en fase estacionària de creixement.

a. Per a preparar un inòcul aproximat de  $10^5$  ufc/mL, es va diluir el brou amb un creixement bacterià estacionari amb MHB estèril per ajustar la seva terbolesa al patró nº 0,5 de l'escala McFarland. Aleshores, es van fer dilucions decimals de l'inòcul amb una terbolesa ajustada fins a la dilució 1/1000 de la manera següent:

$$1 \text{ mL } (10^8 \text{ ufc/mL}) + 9 \text{ mL MHB} = 10 \text{ mL } (10^7 \text{ ufc/mL})$$

$$1 \text{ mL } (10^7 \text{ ufc/mL}) + 9 \text{ mL MHB} = 10 \text{ mL } (10^6 \text{ ufc/mL})$$

$$3 \text{ mL } (10^6 \text{ ufc/mL}) + 27 \text{ mL MHB} = 30 \text{ mL } (10^5 \text{ ufc/mL})$$

Ja que l'experiment es va realitzar per triplicat, es van preparar 30 mL de la darrera dilució, 10 mL per a cada un dels experiments a realitzar.

Es va preparar una bateria de tubs estèrils de 13x100 mm de vidre amb 20 tubs i es van marcar les concentracions finals, segons l'antibiòtic estudiat.

b. Es van dispensar 0,5 mL de cada dilució d'antibiòtic a cada tub.

- c. Es van transferir 0,5 mL de la dilució de l'inòcul en fase estacionària a cadascun dels tubs.
- d. Es van incubar a 37° C durant 24 h en aire ambient.
- e. A les 20 h d'incubació, es van agitar els tubs sense creixement visible amb un agitador durant 15'' i es van reincubar durant 4 h més.
- f. Es van recollir les dades de CIM en un full de resultats.

Així, l'interval de concentracions en l'estudi de sensibilitat de la rifampicina va ser de 0,0001-128 µg/mL. En el cas de la vancomicina l'interval va ser de 0,12-512 µg/mL i el de la ciprofloxacina va ser de 0,12-128 µg/mL.

**\* Processament dels bacteris en fase adherent o en biocapes.-**

- a. Per a assegurar al màxim que la prova de sensibilitat es feia exclusivament en els bacteris que estaven adherits al catèter, amb pinces estèrils es va fer un rentat mitjançant un passi progressiu dels segments del catèter per tres plaques de Petri amb MHB estèril i es va agitar. D'aquesta manera es van eliminar els bacteris que no estaven adherits al catèter.
- b. Es va preparar una bateria de tubs estèrils de vidre de 13x100 mm per a l'estudi de la fase adherent amb un mL de cada concentració d'antibiòtic. Com a inòcul, es va afegir a cada tub un segment de catèter.  
L'interval de concentracions va ser de 0,25-1024 µg/mL per a vancomicina, de 0,25-256 µg/mL per a ciprofloxacina i de 0,0002-256 µg/mL per a rifampicina.
- c. Es van incubar a 37° C durant 24 h en aire ambient.
- d. A les 20 h d'incubació, es van agitar els tubs sense creixement visible amb un agitador durant 15'' i es van reincubar durant 4 h més.

Es va prendre com a definició de CIM la mateixa indicada anteriorment (apartat 3.1.1., pàgina 49).

Per la quantificació de l'inòcul adherit es va sonicar 5 minuts a 50 Hz un dels segments del catèter submergit en 1 mL de MHB. Es van sembrar 100 µL en MHS de les dilucions adients per a recompte i es van incubar 24 h a 37° C en aire ambient.

**Concentració Bactericida Mínima.**

**\* Processament dels bacteris en fase estacionària.-**

Com s'ha indicat anteriorment, es van adaptar els procediments descrits segons les normes de la NCCLS per a la determinació de la CBM (200).

**\* Processament dels bacteris en fase adherent o en biocapes.-**

- a. A les 24 h d'incubació es va retirar el medi de cultiu de tots els tubs sense creixement visible fins al tub amb la concentració més alta en la que es va observar creixement i es va canviar per un mL de MHB estèril.
- b. A continuació es van sonicar a 50 Hz durant 5 minuts i es van centrifugar a 3000 rpm durant 10 minuts.
- c. Es va decantar el sobrenedant i es va resuspendre el sediment amb 1 mL de MHB estèril. Es va repetir el centrifugat a 3000 rpm durant 10 minuts. L'objectiu del doble centrifugat va ser eliminar les restes d'antibiòtic.
- d. Es va decantar de nou el sobrenedant i es va resuspendre el sediment amb 1 mL de MHB.
- e. Es van agitar els tubs 5" i es van sembrar 100 µL en placa de MHS.
- f. Es va incubar durant 48 h a 37° C en aire ambient.
- g. Es va comptar el número de colònies i es va anotar en un full de resultats.

Es va prendre com a definició de la Concentració Bactericida Mínima la mateixa indicada anteriorment (apartat 3.1.1., pàgina 49).

El control de qualitat de la tècnica de sensibilitat "in vitro" es va realitzar:

1. Incubant a cada sessió de treball un tub de control de creixement en MHB lliure d'antibiòtic inoculat amb la soca en estudi.
2. Incubant a cada sessió de treball un tub en MHB lliure d'antibiòtic inoculat amb un segment de catèter amb la biocapa de la soca utilitzada a cada sessió com a control de creixement.
3. El subcultiu quantitatiu de l'inòcul. D'aquesta manera es van poder detectar contaminacions i quantificar l'inòcul.
4. Incubant a cada sessió de treball un tub de control d'esterilitat amb brou sense antibiòtic ni microorganisme.
5. Mitjançant la realització dels experiments per triplicat.

### 3.1.3- Avaluació “in vitro” de l’activitat antimicrobiana de combinacions de vancomicina o ciprofloxacina amb heparina o rifampicina.

L’existència de sinèrgia, antagonisme o indiferència entre vancomicina o ciprofloxacina amb heparina o rifampicina davant de soques d’estafilococ es va estudiar mitjançant el mètode de les corbes de letalitat (201).

Aquesta tècnica es basa en la quantificació dels bacteris a uns temps predeterminats en cultius amb antibiòtics sols o en combinació. En el nostre estudi els temps van ser de 4 i de 24 h. També vàrem utilitzar aquesta tècnica per a estudiar les interaccions dels antibiòtics amb heparina.

Els estudis de les combinacions de vancomicina o ciprofloxacina amb heparina es van realitzar en quatre soques de *S. aureus* i els estudis de les combinacions de vancomicina o ciprofloxacina amb rifampicina es van realitzar en sis soques.

Les corbes es van realitzar usant MHB amb un inòcul bacterià de l’ordre de  $10^7$  ufc/mL en fase de creixement exponencial.

La concentració d’heparina va ser de 2500 UI/mL. Les concentracions d’antibiòtic usades eren iguals a la CIM de cada antibiòtic per a cadascuna de les soques estudiades.

Els tubs d’assaig es van incubar durant 24 h a 37° C en aire ambient i en els temps 0, 4 i 24 h es van recollir 0,5 mL de cada tub i de les dilucions apropiades es van subcultivar 0,05 mL en MHS. Després de la incubació dels subcultius a 37° C en aire ambient durant un temps màxim de 48 h, els recomptes bacterians van ser expressats com a  $\log_{10}$  ufc/mL.

Cada experiment es va realitzar per triplicat.

Sinèrgia i antagonisme es van definir, respectivament, com almenys un increment o decrement  $\geq 2 \log_{10}$  de la mort bacteriana de les combinacions a les 24 h comparat amb l’agent més actiu (201).

Tot seguit es descriu el procés de preparació de l’inòcul, comú per a les determinacions, i els procediments específics per a cadascuna d’elles.

### **3.1.3.1- Vancomicina o ciprofloxacina i heparina.**

### **3.1.3.2- Vancomicina o ciprofloxacina i rifampicina.**

#### **\* Preparació de l'inòcul.-**

La preparació de l'inòcul per a les determinacions de les corbes de letalitat es va fer seguint els mateixos procediments que els indicats a l'apartat 3.1.1. a la pàgina 50, per a aconseguir un inòcul de l'ordre de  $10^8$  ufc/mL.

#### **\* Preparació de les solucions d'heparina.-**

a. Com s'ha explicat anteriorment, es va preparar una solució mare d'heparina en sèrum fisiològic a 12500 UI/mL. Es va preparar un volum de 18 mL per experiment.

b. Es va descongelar una alíquota d'1 mL de cadascun dels antibiòtics a utilitzar (vancomicina i ciprofloxacina 1000 µg/mL) de la solució d'emmagatzematge. Posteriorment, es van preparar dilucions apropiades de l'antibiòtic en el medi de cultiu per a aconseguir concentracions 5 vegades la final a utilitzar (ja que el volum final va ser de 5 mL i a cada tub es va posar 1 mL de cadascun dels antibiòtics a utilitzar).

Es va variar el volum preparat en funció del número de corbes a realitzar.

#### **\* Preparació de les dilucions d'antibiòtic.-**

Es van seguir les següents etapes:

a. Es va descongelar una alíquota d'1 mL de cadascun dels antibiòtics a utilitzar (vancomicina, ciprofloxacina i rifampicina 1000 µg/mL) de la solució d'emmagatzematge. Posteriorment, es van preparar dilucions apropiades de l'antibiòtic en el medi de cultiu per aconseguir concentracions 5 vegades la final a utilitzar. Es van preparar 12 mL de vancomicina, 12 mL de ciprofloxacina i 18 mL de rifampicina.

b. Es van marcar els tubs amb el codi d'identificació de la soca i l'antibiòtic amb la concentració utilitzada. Els tubs utilitzats van ser estèrils de vidre de 16x100 mm i amb tap de rosca hermètic.

A partir de les solucions anteriors es van seguir les següents etapes per a preparar la bateria de tubs d'assaig:

- a. En els tubs d'assaig on es va estudiar un sol antibiòtic, a 1 mL de la solució antibiòtica anterior s'hi van afegir 3,75 mL de MHB i 0,25 mL de l'inòcul inicial de l'ordre de  $10^8$  ufc/mL. En el cas dels tubs d'assaig on es va estudiar l'efecte de la combinació d'un antibiòtic amb heparina o de dos antibiòtics, a 1 mL de la solució final indicada d'heparina i de cadascun dels antibiòtics, es van afegir 2,75 mL de MHB i 0,25 mL de l'inòcul bacterià inicial. El volum final de cada tub d'assaig va ser sempre de 5 mL.
- b. Una vegada inoculats els tubs amb l'inòcul, abans d'incubar-los es va recollir mostra i es van fer dilucions apropiades pel recompte. Es van subcultivar 0,05 mL de la dilució apropiada en plaques de MHS. A aquesta mostra la denominarem  $T_0$  (temps zero).
- c. Es van incubar tots els tubs a  $37^\circ\text{C}$  en aire ambient durant 24 h.
- d. A les 4 h i a les 24 h es van retirar de l'estufa els tubs i es van subcultivar les mostres. Es va recollir una alíquota i es van fer dilucions fins de l'ordre de 1/1.000.000 de cada mostra. Es van subcultivar 0,05 mL de la dilució apropiada en plaques de MHS. A aquestes mostres les denominarem, respectivament,  $T_4$  i  $T_{24}$ .
- e. A les 48 h d'incubació a  $37^\circ\text{C}$  en aire ambient de les plaques amb els subcultius quantitius, es va comptar el número de colònies del cultiu de la dilució que va permetre el recompte de colònies.

Es van reproduir els experiments per triplicat.

Per a valorar si l'heparina o els antibiòtics en combinació tenien efecte sinèrgic es va calcular la disminució del número de colònies de *S. aureus* en un donat interval de temps (24 h), respecte del control de creixement utilitzat, per a cada soca.

En aquests estudis d'interaccions entre heparina i/o antibiòtics o entre antibiòtics es va definir :

\* **SINERGIA o efecte sinèrgic de la combinació** quan l'associació de l'antibiòtic amb heparina (vancomicina amb heparina o ciprofloxacina amb



heparina) o la dels antibiòtics (vancomicina amb rifampicina o ciprofloxacina amb rifampicina) va produir un increment de la mort bacteriana a les 24 h  $\geq$  100 vegades (mesurat com a recompte bacterià) respecte de l'agent individual més actiu.

\* **ANTAGONISME o efecte antagònic de la combinació** quan l'associació de l'antibiòtic amb heparina (vancomicina amb heparina o ciprofloxacina amb heparina) o la dels antibiòtics (vancomicina amb rifampicina o ciprofloxacina amb rifampicina) va produir una disminució de la mort bacteriana a les 24 h  $\geq$  100 vegades (mesurat com a recompte bacterià) respecte de l'agent individual més actiu.

\* **ADDICIÓ O INDIFERÈNCIA** quan es va donar un canvi en la mortalitat bacteriana 10 vegades major o menor de l'efecte de la combinació respecte de cadascun dels fàrmacs per separat.

#### Control de qualitat de les corbes de letalitat.-

El control de qualitat de la tècnica de sensibilitat "in vitro" es va realitzar:

1. Incubant a cada sessió de treball un tub de control de creixement en brou inoculat amb cadascuna de les soques utilitzades en cada sessió i sense antibiòtic.
2. Incubant a cada sessió de treball un tub de control d'esterilitat amb brou de MHB sense antibiòtics ni microorganismes.
3. Realitzant els experiments per triplicat.

Es presenten els resultats com a representació gràfica en la que en les abscisses es representa el temps i a les ordenades el  $\log_{10}$  dels recomptes bacterians en ufc/mL. Cada gràfica s'acompanya de la respectiva taula de valors.

### **3.2- Avaluació de l'estabilitat de les combinacions de vancomicina o ciprofloxacina amb heparina o rifampicina.**

Per a estudiar l'estabilitat de vancomicina o ciprofloxacina amb heparina o amb rifampicina es van preparar solucions amb 2500 UI/mL d'heparina i 2000 µg/mL de vancomicina, 1000 o 2000 µg/mL de ciprofloxacina i 3000 µg/mL de rifampicina de forma asèptica a partir de les solucions comercials.

Les solucions es van preparar de la mateixa manera que la indicada en el model animal de la infecció del catèter per la tècnica de l'antibiòtic-lock (veure apartat 3.3.1.7, pàgina 86).

Les solucions d'antibiòtic sol, d'heparina-antibiòtic o d'antibiòtic-antibiòtic es van introduir en flascons estèrils, es van incubar a 37° C en aire ambient i les aliquotes obtingudes a les 0, 24, 48 i 72 h es van congelar a -80° C. Totes les aliquotes es van processar el mateix dia.

Les concentracions de vancomicina van ser determinades per immunoassaig (Axsym Analyser, Abbott Laboratories, Chicago, Illinois, USA) seguint les instruccions del fabricant.

Les determinacions de ciprofloxacina van ser fetes pel mètode del bioassaig en disc-placa. El bioassaig d'antibiòtics es basa en la comparació de la resposta d'un microorganisme indicador front a una concentració desconeguda d'antibiòtic amb la resposta del mateix microorganisme indicador sota idèntiques condicions d'assaig, a una concentració coneguda d'antibiòtic. Pel bioassaig amb ciprofloxacina el microorganisme indicador usat va ser la soca *K. pneumoniae* ATCC 1031 i el medi d'assaig Antibiotic Medium 5.

Les concentracions de rifampicina van ser estudiades pel mètode de la cromatografia líquida en fase reversa i columna curta (30 mm).

Els estudis d'estabilitat es van fer en mostres de vancomicina, de ciprofloxacina i de rifampicina soles i en les combinacions i concentracions que s'indiquen a la taula adjunta i que són les que es van estudiar al model animal.

	H 2500 UI/mL	R 3000 µg/mL
V 2000 µg/mL	X	X

<b>C 1000 µg/mL</b>	<b>X</b>	<b>-</b>
<b>C 2000 µg/mL</b>	<b>-</b>	<b>X</b>

Tot seguit es descriuen els procediments específics per a cadascuna de les tècniques.

### **3.2.1- Estabilitat de vancomicina o ciprofloxacina amb heparina.**

Es van preparar asèpticament solucions amb 2500 UI/mL d'heparina, 2000 µg/mL de vancomicina i 1000 µg/mL de ciprofloxacina .

Vancomicina, ciprofloxacina i heparina van ser obtingudes respectivament de preparacions comercials: Diatracin<sup>®</sup> (Dista S.A., Alcobendas, Madrid, España), Baycip<sup>®</sup> (Química Farmacéutica Bayer S.A., Barcelona, España) i heparina ROVI<sup>®</sup> (Rovi S.A., Madrid, España).

Les solucions es van preparar de la mateixa manera que la indicada en el model animal de la infecció del catèter per la tècnica de l'antibiòtic-lock (veure apartat 3.3.1.7, pàgina 86).

Es van disposar 20 mL de les solucions d'antibiòtic amb heparina en flascons estèrils a 37° C en aire ambient i les aliquotes obtingudes per triplicat seqüencialment en els temps 0, 24, 48 i 72 h van ser congelades a -80° C en tubs tipus Eppendorf pel seu anàlisi posterior.

### **3.2.2- Estabilitat de vancomicina, ciprofloxacina i rifampicina soles o en combinació.**

En el cas dels antibiòtics sols o de la combinació amb rifampicina les solucions es van disposar en flascons estèrils a 37° C en aire ambient i les aliquotes obtingudes seqüencialment per triplicat en els temps 0, 24, 48 i 72 h van ser congelades a -80° C en tubs tipus Eppendorf pel seu anàlisi posterior. Totes les mostres van ser processades el mateix dia.

Les concentracions de vancomicina van ser determinades per immunoassaig seguint les instruccions del fabricant (Axsym Analyser, Abbott Laboratories,

Chicago, Illinois, USA). El límit de detecció de la prova va ser de 1,25 µg/mL i els coeficients de variació inter i intrassaig van ser inferiors al 7%.

Les determinacions de rifampicina van ser fetes pel mètode de cromatografia líquida en fase reversa i columna curta (30 mm). El límit de detecció de la prova va ser de 0,1 µg/mL i els coeficients de variació de 5,4% i 7,9% intra i interassaigs respectivament.

Les determinacions de ciprofloxacina van ser fetes pel mètode del bioassaig en disc-placa utilitzant com a microorganisme indicador la soca *K. pneumoniae* ATCC 1031 i el medi d'assaig Antibiotic Medium 5 (202).

### 3.2.2.1- Procediments del bioassaig.

#### \* Preparació de l'inòcul.-

- a. Es va descongelar una alíquota del cultiu d'emmagatzematge de la soca *K. pneumoniae* ATCC 1031.
- b. Es van subcultivar 50 µL per duplicat en MHS a 37° C durant 18-20 h en aire ambient.
- c. De la placa de MHS es van aïllar 5-7 colònies, es van inocular en 10 mL de MHB i es van incubar durant 24 h a 37° C en aire ambient.
- d. Es van preparar 20 plaques d'Antibiotic Medium 5 (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) com a medi d'assaig. La placa d'agar del bioassaig estava formada per una base d'agar Antibiotic Medium 5 i per sobre una altra capa del mateix medi amb l'inòcul de *K. pneumoniae* ATCC 1031.
- e. Es va preparar la base de les plaques dispensant 10 mL d'agar a cada placa de Petri (90x15 mm). Es va deixar solidificar en superfície plana durant 5-10 minuts. Es va aixecar una mica la tapa per a que desaparegués l'excés d'humitat.
- f. Es van posar les plaques solidificades en estufa a 37° C. Aquest procediment va facilitar la posterior difusió del medi Antibiotic Medium 5 inoculat amb la soca de *K. pneumoniae*.
- g. Es va deixar que el flascó amb 100 mL d'Antibiotic Medium 5 s'atemperés al bany Maria fins a arribar a 50° C. Quan va arribar a aquesta

temperatura (mesurant amb un termòmetre estèril directament a l'interior del flascó), es van afegir 2 mL de l'inòcul de *K. pneumoniae* ATCC 1031.

h. Es van dispensar amb pipeta estèril 5 mL del flascó amb la soca de *K. pneumoniae* a cada una de les plaques de Petri amb la base d'Antibiotic Medium 5.

i. Es van moure suaument en pla per a facilitar la difusió del medi per tota la placa abans no solidificués. Una vegada solidificat, es va conservar a 4° C fins a un màxim de 7 dies abans de la realització de l'experiment.

**\* Preparació de l'estàndard.-**

a. Es va descongelar una alíquota de solució mare de ciprofloxacina a concentració de 1000 o 2000 µg/mL.

b. Es van fer les dilucions de la solució mare per a obtenir 1 mL de cadascuna de les següents concentracions estàndard de ciprofloxacina: 0,15, 0,3, 0,5, 0,7 i 0,9 µg/mL en sèrum fisiològic ja que és el medi en el que es prepara la solució de tractament. En el nostre estudi la concentració 0,5 µg/mL va ser la concentració dita de referència.

Aquest interval de concentracions de l'estàndard s'ha determinat fent varis assajos fins que l'interval de les concentracions va aconseguir uns diàmetres d'inhibició entre 15-20 mm. Aquestes concentracions han correspost a la zona on es manté la relació lineal entre les concentracions d'antibiòtic i els diàmetres d'inhibició.

**\* Preparació de les mostres problema.-**

L'estudi de l'estabilitat es va realitzar a 4 temps: a les 0, 24, 48 i 72 h. Per a cadascun dels temps es van recollir tres alíquotes que es van processar per triplicat.

Partint de la hipòtesi que la concentració teòrica que s'esperava de la mostra problema era de 1000 o 2000 µg/mL i que aquesta va mantenir l'estabilitat, amb cadascuna d'elles es van fer dilucions apropiades per a obtenir una concentració que estigués dins l'interval de les concentracions de l'estàndard, i, idealment, al punt mig d'aquest interval.

Tant per a la preparació de les mostres problema com les de l'estàndard es va procurar fer el mínim nombre de dilucions per a disminuir al màxim l'errada experimental.

Es van recuperar les plaques d'Antibiotic Medium 5 preparades i es van deixar atemperar.

a. Es van dispensar 20  $\mu\text{L}$  de les dilucions problema i de les dilucions de l'estàndard preparades en discs de paper de filtre estèrils de 6 mm (Sterile blanks. Difco).

b. Quan es van haver preparat un màxim de cinc discos de la manera indicada, es van dipositar de forma suau sobre la placa de bioassaig, garantint el contacte disc-placa. Cada placa va incloure un disc amb la concentració de referència de les concentracions de l'estàndard preparades i quatre discos més, cadascun d'ells amb una mostra d'un dels quatre temps d'estudi de l'estabilitat de ciprofloxacina.

c. Les mostres es van estudiar per triplicat i l'estàndard per quintuplicat en plaques diferents.

d. Una vegada preparada, cada placa es va posar en nevera durant 30 minuts per a facilitar la difusió de l'antibiòtic sense que es produís creixement del microorganisme.

e. Passat aquest temps, es van incubar les plaques durant 24 h a 37° C en aire ambient.

f. Es van llegir amb calibre els halus d'inhibició en mm i fins a 1 decimal. No van ser vàlids per l'experiment els diàmetres que van estar fora de l'interval de valors que es van establir en la recta de calibració.

g. Per a la interpretació dels resultats, es va calcular la mitjana dels diàmetres corresponents a cadascuna de les concentracions de l'estàndard.

h. Es va construir la gràfica a partir de les mitjanes dels diàmetres de cada concentració a l'eix d'abscisses i el logaritme de cada concentració a les ordenades.

i. Es va calcular la mitjana dels diàmetres de la concentració de referència de les plaques de l'estàndard a partir de la corba estàndard i la

mitjana dels diàmetres de la concentració de referència de les plaques amb les mostres problema. Es va calcular la diferència entre aquestes dues mitjanes.

j. Es va llegir cada diàmetre de la concentració problema, es va calcular la mitjana dels diàmetres per a cada concentració i se li va sumar la diferència de mitjanes anterior.

k. Es van calcular amb la recta anterior els valors de les concentracions d'antibiòtic.

l. Es va multiplicar la concentració obtinguda pel factor de dilució aplicat a la mostra.

El coeficient de correlació ( $r^2$ ) de la recta estàndard va ser 0,9. El límit de detecció de l'assaig va ser de 0,04  $\mu\text{g/mL}$ , i els coeficients de variació en un dia o entre dies pels replicats ( $n=7$ ) a 0,2 i 4  $\mu\text{g/mL}$  va ser inferior al 5%.

Fins aquí s'ha descrit la tècnica del bioassaig per a ciprofloxacina, independentment de si estava combinada amb heparina o amb rifampicina. Però per aquelles mostres en les que estava combinada amb heparina, per a garantir que les concentracions d'heparina de l'assaig no van influenciar el creixement de la soca indicador *K. pneumoniae* ATCC 1031 es va determinar la CIM de l'heparina pel mètode de la macrodilució. La CIM de l'heparina per aquesta soca va ser superior a 6000 UI/mL.

De la mateixa manera, en aquelles mostres en les que la ciprofloxacina es va combinar amb rifampicina, per a confirmar que aquesta no tenia cap efecte en la inhibició del creixement bacterià de la soca *K. pneumoniae* ATCC 1031 es va realitzar la CIM pel mètode de la macrodilució en MHB i es va trobar que la CIM per aquesta soca era de 64  $\mu\text{g/mL}$ .

Donat que per a la realització del bioassaig de ciprofloxacina es van realitzar dilucions per aconseguir una concentració màxima de 0,9  $\mu\text{g/mL}$ , la concentració màxima esperada d'heparina en aquestes mostres va ser de 2,25 UI/mL i la de rifampicina va ser de 1,35  $\mu\text{g/mL}$ . Per a l'heparina aquesta

concentració va ser almenys més de 2600 vegades menor a la CIM i per a la rifampicina va ser 47 vegades menor a la CIM determinada per la qual cosa es pot considerar que en les combinacions ni heparina o rifampicina no van afectar al creixement bacterià en la placa de bioassaig.



### **3.3- Estudis en el model animal d'infecció per catèter.**

#### **3.3.1- Descripció del model animal.**

Els experiments que a continuació es descriuran van ser aprovats pel Comitè Ètic d'Investigació dels Hospitals de la Vall d'Hebron i van seguir totes les Normatives Ètiques vigents que sobre experimentació animal s'han indicat anteriorment (193-198).

##### **3.3.1.1- Animal.**

Es van utilitzar conills mascles blancs New Zealand, amb un pes entre 2 i 2,1 Kg. Els animals van ser transportats fins al laboratori en caixes individuals. El temps màxim de transport va ser de dues hores.

Quan van arribar els animals al laboratori van ser pesats, inspeccionats i col·locats en gàbies individuals. Es van mantenir un màxim de 7 dies en observació per a descartar que no presentessin cap patologia. Una vegada al dia van ser revisats per un tècnic per a comprovar-ne l'estat de salut.

L'estabulari on es van allotjar va presentar unes condicions específiques i constants de llum i temperatura. El cicle llum-fosc es va mantenir constant, amb llum des de les 7 h fins a les 19 h. Això va permetre que el ritme circadià dels animals es mantingués invariable.

Només es van utilitzar animals totalment sans. Van poder disposar d'aigua i pinso "ad libitum". Es va utilitzar pinso compost per a conills. La quantitat consumida de pinso per animal-dia va ser de 100-150 g/dia.

##### **3.3.1.2- Microorganisme.**

Per a l'estudi del model animal es van usar les dues soques de *S. aureus* (N16-2 i D22-1) que després de ser avaluades van mantenir un comportament

més homogeni durant els experiments d'estandardització del model. (veure apartat 3.0. Microorganisme, pàgina 48).

### **3.3.1.3- Catèter.**

Es va utilitzar un catèter de silicona (*Tube silicone, SILASTIC®*, ID/OD:0.45/0.77" a Dow Corning Corporation, MI, USA). Els segments de catèter utilitzats tenien una llargada de 16 cm. Van ser connectats a una connexió recanviable (*Vygon® 1298.20, Laboratoires Pharmaceutiques Vygon, Ecoulen, France*) i aquesta en va ser a una clau de tres vies (*Connecta® Plus 3, Ohmeda, Helsingborg, Sweden*), iguals a les que es fan servir a la clínica.

Es van medir els segments de catèter estèrils i se'ls va fer una marca amb rotulador a sis cm d'un extrem. A l'altre extrem es va inserir la connexió de Vygon® i a aquesta la clau de tres vies. Posteriorment, es van esterilitzar pel mètode d'òxid d'etilè.

Abans de la inserció quirúrgica del catèter es van cebar els catèters amb sèrum fisiològic estèril, es va obrir el pas de la clau de tres vies cap al catèter i es va tancar quan sortia el sèrum per l'extrem distal. Una vegada cebats el catèter, la connexió i la clau, es van deixar coberts amb una talla quirúrgica a la taula del quiròfan.

Es van preparar tants catèters com animals s'havien d'operar en cada sessió. En cada grup d'experiment es va operar un número variable d'entre 10 a 18 conills.

### **3.3.1.4- Tècnica quirúrgica.**

\* Material necessari.-

Conills New Zealand de 2 kg de pes aproximat

Ketolar® 50 mg (ketamina)

Rompún® (xylazene)

Povidona iodada

Gasses estèrils  
Guants estèrils  
Fulles de bisturí nº 11 estèrils  
Pinces hemostàsiques sense dents  
Pinces amb dents  
Pinces de Kocher  
Tisores grans  
Tisores petites per a fer la incisió del vas  
Sonda acanalada  
Introductor de catèter  
Sutura de seda 2/0 agulla recta  
Sutura de seda 2/0 sense agulla  
Agulles i.v.  
Xeringes de 5 mL  
Armillles i collars per a conills

Així com els segments de catèter amb la connexió i la clau de tres vies connectades.

#### **3.3.1.4.1- Anestèsia.**

Al mateix estabulari, es va procedir a l'anestèsia general de l'animal per via intramuscular amb la injecció d'una barreja de Ketamina 5mg/mL (Ketolar<sup>®</sup>) i Xylazene 1 mg/mL (Rompún<sup>®</sup>). La dosi anestèsica de la barreja va ser de 1,5 mL/kg, per la qual cosa es va injectar un volum total de 3 mL, 1,5 mL a cada cuixa.

L'efecte anestèsic s'iniciava als 5 minuts de la injecció i es perllongava de 25 a 35 minuts. Es va considerar l'animal anestesià quan va desaparèixer el reflex corneal.

Una vegada l'animal estava anestesià, es va rasurar el pèl de la zona lateral del coll.

#### **3.3.1.4.2- Inserció del catèter.**

Es va traslladar l'animal a la zona quirúrgica on es va realitzar la intervenció en condicions d'asèpsia.

Es va col·locar l'animal en decúbit supí amb el coll en màxima extensió. Es va desinfectar amb povidona iodada la zona ventral del coll.

Amb les pinces amb dents es va agafar la pell de la meitat dreta del coll a nivell del terç superior de la línia mitja del cantó dret i amb una fulla de bisturí, es va fer una incisió paramedial dreta de 2-3 cm prop de la tràquea. Es va eixugar la sang de la ferida i només separant les vores de la ferida ja es va observar la unió de les branques de la jugular externa i interna amb el tronc comú de la jugular.

Subjectant les vores de la ferida amb pinces, es va procedir a fer una dissecció roma amb l'objectiu d'aïllar i dissecar la branca jugular interna, des del punt de la bifurcació fins el trajecte més distal i posar a plànol la vena jugular comú. La vena jugular interna es va aïllar de la circulació mitjançant lligadura distal a uns 1,5-2 cm del tronc comú de la jugular. Els fils de la lligadura es van tensar per darrera del cap del conill.

Amb les pinces es va agafar la vena aïllada i amb les tisores petites es va fer una petita incisió a la vena el més propera possible al punt d'unió de les dues branques (0,3-0,4 cm de la bifurcació). Es va introduir la punta de l'introduïdor de catèters i es va obrir la llum de la vena. Es va deixar posat l'introduïdor, es va agafar un catèter preparat i es va introduir l'extrem distal amb l'ajuda de l'introduïdor. Es va retirar l'introduïdor i es va acabar d'introduir el catèter fins a la marca de 6 cm.

El catèter es va fixar a la vena mitjançant lligadura doble aprofitant el segment de vena que quedava fora de la circulació entre la lligadura proximal i el punt distal d'entrada del catèter amb fil de sutura de seda 2/0. Els nusos van ser fermes però no massa forts, de manera que vàrem garantir la subjecció del catèter i evitarem l'extravasació de sang i, per altra banda, vàrem mantenir la permeabilitat del catèter. Per a garantir que el catèter va ser ben lligat es va traccionar suaument del fragment extern i es va comprovar que no sortia.

Per a comprovar la permeabilitat del catèter es va connectar una xeringa al catèter, es va obrir el pas del mateix i es va aspirar, fins a comprovar la

sortida de sang, es va introduir sèrum fisiològic, es va comprovar que no hi havia resistència i que es netejava de sang la clau, la connexió i el catèter. Es va tancar el pas del catèter i es va desconnectar la xeringa.

Comprovada la permeabilitat del catèter, amb el procés abans indicat, es van retallar els fils de la fixació i els proximals que feien tracció.

Es va girar el conill cap al cantó esquerre i es va pinçar el catèter amb les pinces de Kocher i es va separar de la connexió. Amb una sonda acanalada es va tunelitzar un trajecte a través del teixit subcutani de l'animal. Allí on feia protusió la sonda, a nivell de la zona interescapular a la línia mitjana, es va fer una incisió amb una fulla de bisturí i es va fer sortir la punta de la sonda. Seguint el trajecte de la sonda, es va fer passar l'extrem distal del mateix i es van exterioritzar 4-5 cm de catèter fins la zona interescapular.

Es va retirar la sonda acanalada i es va tornar a acoblar el catèter a la connexió i a la clau de tres vies. Es va despinçar i es va tornar a comprovar la permeabilitat aspirant una mica de sang i injectant sèrum fisiològic a través d'una xeringa connectada a la clau de tres vies. Comprovat això, es va tancar la clau de pas i es va desconnectar la xeringa.

Finalment, amb seda 2/0 amb agulla es va fixar la connexió i la clau de tres vies a l'esquena de l'animal mitjançant un punt de lligadura.

Per acabar, es va girar l'animal es va tancar la ferida quirúrgica i mitjançant seda 2/0 i agulla amb sutura continua es va suturar la ferida.

Durant tot el procés d'inserció del catèter, aquest va estar cebat amb sèrum fisiològic a fi i efecte d'evitar aspiracions i formació de trombus.

Una vegada realitzada, es va vestir l'animal per a protegir el catèter i se li va col·locar un collar de cel·luloide per a protegir el vestit de les mossegades.

Acabat el procés, l'animal es va portar a la gàbia amb una tarja identificativa en la que hi constava el número d'animal, el dia de l'experiment i l'experiment realitzat.

### **3.3.1.5- Infecció.**

\* **Material necessari.**-

Tub amb inòcul bacterià preparat

Xeringes de 1 mL estèrils

\* **Preparació de l'inòcul.**-

Es va descongelar una alíquota de la soca *S. aureus* en estudi (*S. aureus* N16-2 o D22-1, segons els experiments) del cultiu d'emmagatzematge.

Es van subcultivar 50 µL per duplicat en MHS a 37° C durant 18-20 h en aire ambient.

De la placa de MHS, es van aïllar 5-7 colònies ben diferenciades i es van inocular en MHB precalentat a 37° C. Es van incubar 37° C durant 2 a 4 h fins aconseguir que el cultiu tingués una terbolesa ajustada al patró nº 0,5 de l'escala de McFarland. Amb aquesta terbolesa l'inòcul aproximat va ser de 10<sup>8</sup> ufc/mL.

\* **Determinació de la concentració de l'inòcul.**-

Es va determinar la puresa i la concentració de l'inòcul segons els procediments descrits anteriorment.

El volum de l'inòcul preparat va dependre del número d'animals operats i va oscil.lar entre 8 i 13 mL.

Per a quantificar l'inòcul, es van sembrar 50 µL de les dilucions decimals adients en plaques de MHS.

\* **Infecció.**-

Es va agitar el tub amb l'inòcul per tal d'homogeneïtzar-lo. Es van preparar tantes xeringues amb 0,7 mL de MHB amb l'inòcul bacterià com animals es van operar.

Es van purgar les xeringues per a evitar la producció d'embòlies gasoses a l'animal.

Es va passar a l'estabulari on hi havia els animals en gàbies individuals. Es va comprovar que es despertaven i es va procedir a la infecció amb l'inòcul a partir de les sis hores des de l'inici de les intervencions.

Es va treure l'animal de la gàbia i es va posar dins l'immobilitzador per a facilitar les maniobres i per a evitar que amb aquestes es despregués el catèter. Es va obrir la cremallera de l'armilla fins a deixar accessible la clau de tres passos. Es va agafar una xeringa i es va connectar a la clau de tres passos. Es va obrir el pas de la clau cap a l'animal. Amb injecció suau i continua es va prémer l'èmbol de la xeringa i es van introduir els 0,7 mL de l'inòcul, volum requerit per a omplir el catèter, la connexió i la clau.

Es va tancar la clau i es va desconnectar la xeringa. Es va comprovar que durant el procés la punta metàl·lica de la connexió no havia perforat el catèter i que l'inòcul no s'havia extravassat.

Es va tancar la cremallera de l'armilla. Es va tornar l'animal a la gàbia i es va anotar a la targeta el procediment realitzat i el dia.

En els estudis d'estandardització es van confirmar les soques d'estudi, la concentració de l'inòcul necessari i el temps necessari de contacte de l'inòcul amb el catèter abans d'iniciar el tractament per produir la infecció del catèter a tots els animals.

En els grups de l'estandardització, l'inòcul es va deixar en contacte amb el catèter durant 18 h o 48 h. Excedir el temps és crític en aquest model i fa que els animals siguin irrecuperables per la infecció mateixa, donat que no resisteixen molt de temps amb una infecció greu.

En els grups de tractament, l'inòcul es va deixar 18 h en contacte amb el catèter abans d'iniciar el tractament.

#### **3.3.1.6- Avaluació microbiològica.**

\* Material necessari.-

Connexions de Vygon

Claus de tres vies

Palometes endovenoses 21G

Tubs tipus vacutainer

Heparina  
Gasses estèrils  
Alcohol etílic 90°  
Plaques MHS  
Plaques de Petri estèrils  
MHB  
Xeringes de 5 mL, de 2 mL i de 1 mL  
Tubs de poliestirè de 5 i 10 mL

#### **3.3.1.6.1- Hemocultiu perifèric i transcatèter.**

En els experiments d'estandardització del model a les 18 i les 48 h d'induïda la infecció es van obtenir mostres de sang per a hemocultiu perifèric per punció de l'artèria central de l'orella així com mostra de sang obtinguda directament a través del catèter. L'objectiu de l'obtenció d'aquestes mostres va ser l'assegurar l'existència de la bacterièmia amb focus al catèter.

Es van preparar dos tubs vacutainer per a cada animal, per a les dues mostres de sang que es van obtenir de cadascun d'ells.

Es va agafar un animal de la gàbia i se'l va introduir a l'immobilitzador.

Amb una gassa amb alcohol es va fregar el mig de la cara dorsal d'una orella del conill fins que l'artèria central es va dilatar. Es va connectar una xeringa de 2 mL a una palometa.

Es va identificar el tub vacutainer amb el número d'animal i una P (de perifèric).

Si el volum de sang era suficient es punxava un tub vacutainer i s'invertia un parell de vegades.

Una vegada extreta la sang, es va retirar l'agulla i es va fer pressió amb una gassa per a fer hemostàsia.



Per a l'obtenció de la mostra de sang a través del catèter, es va obrir la cremallera de l'armilla fins que es va fer accessible el catèter amb la connexió i la clau de tres vies.

Es va retirar la connexió del catèter.

Es va mantenir l'extrem proximal pinçat per a que no sagnés i es va col·locar una nova connexió i la clau de tres vies estèril cebades amb sèrum fisiològic.

Es va obrir el pas de la clau i es va extreure la sang. Quan es va haver obtingut aproximadament 1 mL es va tancar la clau i es va retirar la xeringa.

Es va obrir el tap del segon tub de vacutainer i es va rotular amb el número de l'animal i amb una T (transcatèter). Es va invertir un parell de vegades per a facilitar la barreja amb l'heparina.

Per al cultiu es van realitzar les dilucions 1/10 i 1/100 en MHB de la sang perifèrica i de la transcatèter, segons es detalla a continuació:

0,1 mL sang (P o T) + 0,9 mL MHB = 1 mL (dilució 1/10)

0,1 mL (dilució 1/10 de la sang T) + 0,9 mL MHB = 1 mL (dilució 1/100)

Es va preparar la dilució 1/100 per a la mostra de sang obtinguda transcatèter per a facilitar la lectura del cultiu. Es va fer una dilució superior a la de l'hemocultiu perifèric perquè, per ser el focus de la infecció, s'esperava obtenir una major concentració de microorganismes.

Es van sembrar 0,05 mL en placa de MHS. Les plaques es van incubar a 37° C durant 24 h en aire ambient.

També es van realitzar hemocultius quantitius pel mètode de la placa vertida.

En el cas de no obtenir creixement en les dilucions es van comptar les colònies crescudes en la sembra per aquest mètode.

Es va barrejar un volum conegut de sang màxim d'un mL o bé el volum que va quedar després de realitzar les dilucions descrites anteriorment, i es va dispensar en una placa de Petri estèril. En el cas que el volum fos inferior a 1 mL es va anotar per a la quantificació posterior.

A continuació es va afegir agar Mueller Hinton fos i mantingut a 45-50° C. Es va deixar refredar. Una vegada solidificat es va incubar en aire ambient a 37° C durant 24 h.

D'acord amb la definició acceptada de bacterièmia per catèter, es va considerar que l'animal tenia una bacterièmia per catèter quan la diferència de recomptes de ufc/mL era de 4 vegades superior en l'hemocultiu de la sang transcatèter respecte de l'hemocultiu de la sang perifèrica (15, 71).

### 3.3.1.6.2- Sacrifici de l'animal.

\* Material necessari.-

Tiopental 0,5 g (Tiobarbital Braun® 0,5 g)

Palometes endovenoses 21G

Talles

Fulles de bisturí nº 11 estèrils

Tisores corbes estèrils

Pinces dentades estèrils

Pinces sense dents estèrils

Gasses estèrils

Alcohol etílic 90°

Xeringues de 5 mL, de 2 mL

Agulles i.v.

MHB

Plaques de MHS

Plaques de Petri estèrils

En el cas dels animals que segons l'experiment de 24 h o 72 h, no van morir durant el període de tractament van ser sacrificats seguint el següent procediment: es va unir una palometa a una xeringa de 2 mL i es va carregar amb 1,5-2 mL de tiopental al 0,5%. En una de les orelles de l'animal es va localitzar la vena marginal i es va fregar amb una gassa amb alcohol. Per a dilatar més la vena, cal dificultar el retorn venós i es pot posar un clip per a tancar el retorn venós. Amb l'agulla de la palometa es va punxar la vena, si s'havia col·locat, es va retirar el clip, i es va injectar el tiopental. L'animal va morir en breus moments.

També es podia injectar el tiopental per punxada intracardíaca. Per això, es va treure l'animal de l'immobilitzador, es va col·locar assegut i se li va aixecar la pota davantera esquerra i es va punxar per sota l'aixella esquerra, dirigint la punta al mig del tòrax i es va aspirar la xeringa per a detectar la sortida de sang i confirmar la posició intracardíaca quan s'hagués atravesat el miocardi. Quan aspirant amb l'èmbol es va confirmar que s'havia atravesat el miocardi amb l'entrada de sang a la xeringa, es va injectar el tiopental.

Una vegada l'animal va ser mort, es va retirar l'armilla i es va procedir a la retirada immediata del catèter i al seu processat.

#### **3.3.1.6.3- Tècnica d'extracció del catèter.**

Es va desinfectar amb una gassa amb alcohol el trajecte extern del catèter i el punt d'inserció.

Amb les pinces estèrils es va agafar el catèter a prop del punt d'inserció a la pell i es va tirar amb cura per a treure el catèter evitant el contacte amb qualsevol superfície i per a evitar que es produís el trencament del segment intravascular del mateix.

Quan es va haver extret, es va posar sobre una placa de Petri i amb unes tisores desinfectades es van tallar els 4 cm distals del catèter deixant-lo caure dins la placa de Petri estèril. Es va col·locar la tapa de la placa i es va rotular amb el número de l'animal.

El cos de l'animal es va processar segons la normativa vigent. Es va dipositar en una bossa d'escombraries i aquesta dins un contenidor de plàstic per animals morts. El contenidor va seguir el règim especial de residus sanitaris.

Si el cultiu del catèter no es realitzava immediatament, els talls de catèter es conservaven en nevera a 4° C un període màxim de 2-4 h.

Tots aquells animals que es van morir per la sèpsia van ser rebutjats per a l'avaluació del model d'infecció.

#### **3.3.1.6.4- Procediments d'avaluació de la infecció del catèter.**

Per a l'avaluació del model, dels quatre cm distals **de la punta del catèter** retirats de forma asèptica de la posició de la vena cava inferior, es realitzaven els següents cultius:

- 1- Mètode quantitatiu endoluminal. **Rentat** segons la tècnica modificada de Cleri (74).
- 2- Mètode semiquantitatiu extraluminal. **Rodatge** per la tècnica de Maki (121).
- 3- Mètode quantitatiu del catèter després de sonicació a 50 Hz. **Sonicat** (131).

Descripció de les tècniques esmentades:

- 1- Mètode quantitatiu endoluminal. **Rentat** del catèter.

Abans de realitzar el rodatge, i sempre amb l'ajuda de pinces estèrils, es fa el rentat endoluminal del catèter amb 2 mL de MHB i xeringa estèril de plàstic amb què es fa fluir el líquid dins el tub. Es repeteix l'operació dues vegades amb el mateix medi de cultiu. Durant el procés s'ha de tenir la màxima cura de que el medi líquid no renti la zona exterior del catèter.

Una vegada realitzat el rentat, per aquells animals que no havien rebut tractament antibiòtic, s'ha procedit a la sembra directa d'aquesta mostra. Es fan dilucions 1/100 del brou del rentat per a permetre la quantificació (segons l'especificat a l'apartat 3.1.1, pàgina 52) i es sembren 0,05 mL de la dilució en placa de MHS. S'incuben les plaques durant 24 h a 37° C en aire ambient.

En el cas dels animals que havien rebut tractament antibiòtic local, els dos mil·lílitres del rentat recollits en tub de plàstic, es van centrifugar a 3000 rpm durant 10 minuts.

En el cas dels experiments amb el model animal realitzats amb combinacions amb heparina, després del primer centrifugat es va resuspendre el sediment amb 2 mL de MHB, mentre que en els experiments del model animal amb les combinacions amb rifampicina, després del primer centrifugat es va decantar el sobrenedant i es va resuspendre el sediment amb 1 mL de MHB estèril. Es va repetir el centrifugat en les mateixes condicions. Es va decantar per segona vegada el sobrenedant i es va resuspendre el sediment amb els

mateixos volums de MHB usats després del primer centrifugat, segons l'experiment. D'aquesta manera es va evitar l'efecte que sobre el creixement bacterià podia tenir l'antibiòtic residual.

Es van fer les dilucions adients, es van sembrar 0,05 mL d'aquesta suspensió en placa de MHS i es va incubar durant 24 h a 37° C en aire ambient.

A més, en els experiments del model animal amb les combinacions amb rifampicina, en els cultius negatius es van sembrar 0,1 mL dels residuals en MHS per a comprovar la negativitat del resultat.

2- Mètode semiquantitatiu extraluminal. **Rodatge** del catèter. Cultiu semiquantitatiu.

Amb l'ajuda de pinces estèrils, es roden els 4 cm distals del catèter 3-4 vegades sobre una placa de MHS.

S'incuba durant 24 h a 37° C en aire ambient.

Un recompte de colònies > 15 ufc/ segment es va interpretar com un resultat positiu.

3- Mètode quantitatiu del catèter després de sonicació a 50 Hz. **Sonicat** del catèter.

Després de fer el rentat i el rodatge, el catèter va ser seccionat longitudinalment a l'interior de la placa de Petri amb l'ajut de les pinces estèrils en dos segments que es van submergir en 4 mL de MHB en tub de plàstic i es van introduir en un bany de sonicació a 50 Hz durant 10 minuts.

Una vegada realitzat el sonicat, per aquells animals que no havien rebut tractament antibiòtic, es va procedir a la sembra directa d'aquesta mostra. Es van fer dilucions 1/100 de cadascuna de les mostres per a permetre la quantificació de l'inòcul (segons l'especificat a l'apartat 3.1.1, pàgina 52) i es van sembrar 0,05 mL de la suspensió en placa de MHS. Es van incubar les plaques durant 24 h a 37° C en aire ambient.

En el cas dels grups de tractament, on els animals havien rebut tractament antibiòtic local, els quatre mililitres del sonicat recollits en tub de plàstic, es van centrifugar a 3000 rpm durant 10 minuts.

En el cas del experiments amb el model animal realitzats amb combinacions amb heparina, després del centrifugat es va resuspendre el sediment amb 4 mL de MHB, mentre que en els experiments del model animal amb les combinacions amb rifampicina, després del primer centrifugat es va decantar el sobrenedant i es va resuspendre el sediment amb 1 mL de MHB estèril. Es va repetir el centrifugat. Es va decantar per segona vegada el sobrenedant i es va resuspendre el sediment amb els mateixos volums de MHB usats després del primer centrifugat, segons l'experiment. D'aquesta manera es va evitar l'efecte que sobre el creixement bacterià podia tenir l'antibiòtic residual.

Com en el cas anterior, es van fer dilucions i es van sembrar 0,05 mL en placa de MHS. Es va incubar durant 24 h a 37° C en aire ambient.

A més, en els experiments del model animal amb les combinacions amb rifampicina, en els cultius negatius es van sembrar 0,1 mL dels residuals en MHS per a comprovar la negativitat del resultat.

El volum de brou obtingut amb aquestes tècniques es va guardar durant 48 h congelat a l'espera de l'obtenció del resultat final.

### 3.3.1.7- Tractament.

\* Material necessari.-

Antibiòtics en la forma comercial preparats a la concentració en estudi

Sèrum fisiològic estèril

Xeringues d'1 mL estèrils

Els animals van ser assignats aleatòriament als següents grups de tractament:

	H 2500 UI/mL <sup>1</sup>	R 3000 µg/mL <sup>2</sup>
<b>V 2000 µg/mL</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b>C 1000 µg/mL</b>	<b>X</b>	-
<b>C 2000 µg/mL</b>	-	<b>X</b>

<sup>1</sup>Tots els grups de tractament del model amb heparina van tenir una durada de 24 h en les dues soques que es van estudiar.

<sup>2</sup>Els grups de tractament dels experiments amb rifampicina van tenir una durada de 24 i de 72 h en la soca estudiada.

Tots els grups de tractament tant dels experiments de 24 h com de 72 h de durada van consistir en una injecció única de tractament local del catèter a les concentracions indicades a les 18 h de la infecció. Es va injectar el volum en dispensació única.

Es va carregar una xeringa amb 0,7 mL de la solució d'heparina, d'antibiòtic o de les combinacions segons el grup de tractament que li correspon.

Es va connectar la xeringa a la clau de tres passos, es va obrir el pas cap al catèter i es va prémer l'èmbol per a omplenar el catèter, la connexió i la clau de tres vies amb la solució que li correspon segons el grup de tractament. Es va tancar la clau i es va retirar la xeringa.

Es va anotar a la tarja el procediment realitzat i el tractament administrat.

Es va tancar la cremallera del vestit, es va retirar l'animal de l'immobilitzador i es va tornar a la gàbia amb la targeta identificativa.

**\* Preparació de les solucions d'heparina i d'antibiòtic amb què es van tractar els animals.-**

\* Heparina.-

A partir de la fórmula comercial es va preparar una dilució a una concentració final de 2500 UI/mL.

\* Vancomicina.-

Es reconstitueix el vial de la forma comercial utilitzada en l'estudi (Diatracin®) amb 500 mg en 10 mL de sèrum fisiològic. S'aconsegueix així la concentració 50 mg/mL. Per a aconseguir la concentració de l'estudi: s'afegeixen 0,2 mL del vial de la forma comercial a 4,8 mL de sèrum fisiològic. S'aconsegueix així la concentració final de 2000 µg/mL.

\* Ciprofloxacina.-

La solució utilitzada a l'estudi (Baycip<sup>®</sup>) ja té la concentració adient per al tractament dels conills, amb una concentració final de 2000 µg/mL.

Per a obtenir la concentració 1000 µg/mL es fa la dilució ½ amb sèrum fisiològic.

\* Rifampicina.-

La forma comercial Rifaldin<sup>®</sup> es compon d'un vial de 600 mg amb 10 mL de solvent.

Per a aconseguir la concentració de tractament desitjada es barreja un vial de 600 mg amb 2 vials de 10 mL. D'aquesta forma la concentració és de 30 mg/mL .

En afegir a 18 mL de sèrum fisiològic 2 mL de la solució antibiòtic indicada, aconseguim la concentració final de 3000 µg/mL.

\* Vancomicina amb heparina.-

Per a aconseguir la concentració de l'estudi: s'afegeixen 0,2 mL del vial de la forma comercial de vancomicina a 3,8 mL de sèrum fisiològic i 1 mL de la solució d'heparina a 12500 UI/mL. S'aconsegueix així la concentració final de 2000 µg/mL de vancomicina i 2500 UI/mL d'heparina.

\* Vancomicina amb rifampicina.-

A 4,5 mL de la solució de vancomicina abans preparada se li afegeixen 0,5 mL de la solució de rifampicina amb una concentració de 3000 µg/mL .

Les concentracions finals de la solució són les mateixes pels dos components: vancomicina 2000 µg/mL i rifampicina 3000 µg/mL.

\* Ciprofloxacina amb heparina.-



De la forma comercial a una concentració 2000 µg/mL s'agafen 2,5 mL i s'afegeixen a 1,5 mL de sèrum fisiològic. A aquesta solució se li afegeix 1 mL de la solució d'heparina a 12500 UI/mL. D'aquesta manera les concentracions finals van ser de 1000 µg/mL de ciprofloxacina i de 2500 UI/mL d'heparina.

\* Ciprofloxacina amb rifampicina. -

De la forma comercial de la ciprofloxacina usada (amb un volum total de 200 mL) es treuen mitjançant xeringa estèril 20 mL. Afegir 20 mL de la solució de rifampicina de concentració 30 mg/mL abans preparada a la botella de Ciprofloxacina (Baycip®).

D'aquesta forma les concentracions finals del preparat són: 2000 µg/mL de ciprofloxacina amb 3000 µg/mL de rifampicina.

En cada experiment s'assajaven almenys dos tractaments, a més del grup control.

S'anota a la tarja el grup de tractament al que pertany l'animal.

**3.3.2- Estudis d'eficàcia terapèutica mitjançant antibiòtic-lock en el model de sèpsia per catèter.**

**3.3.2.1- Eficàcia d'heparina, vancomicina i ciprofloxacina soles o en combinació.**

**3.3.2.2- Eficàcia de vancomicina, ciprofloxacina i rifampicina soles o en combinació.**

**1. Estudis terapèutics.**

Per als estudis d'eficàcia terapèutica es va utilitzar el model animal amb conills New Zealand en experiments que incloïen un número d'animals que va oscil·lar entre 10 i 18 conills. En cada experiment es van estudiar conills de més d'un grup terapèutic i es van incloure dos conills del grup control. Cada grup de tractament va tenir un número d'animals que va oscil·lar entre 7 i 19 animals.

Per als experiments d'eficàcia terapèutica amb heparina sola o en associació amb vancomicina o ciprofloxacina els experiments van tenir una durada de 24 h.

En el cas dels estudis d'eficàcia terapèutica de rifampicina sola o en associació amb vancomicina o ciprofloxacina es van fer dos grups de tractament de 24 h i de 72 h, en els que es va pretendre veure a més si la durada perllongada de l'experiment implicava una pèrdua de l'eficàcia terapèutica aconseguida i afavoria l'aparició de resistències en les soques.

## **2. Avaluació de l'aparició de resistències.**

Per a l'estudi de l'aparició de resistències en els catèters dels conills que havien rebut tractament antibiòtic, simultàniament a la sembra dels cultius quantitius, el rentat i del sonicat, es sembrava un volum de 0,1 mL en plaques de MH amb ciprofloxacina i/o rifampicina, segons si corresponia als grups de ciprofloxacina i rifampicina soles o administrades en combinació. En el cas de l'associació de vancomicina amb rifampicina també es va estudiar l'aparició de resistències a la rifampicina. Les concentracions en estudi van ser de 4 µg/mL en el cas de les plaques per a ciprofloxacina i de 0,04 µg/mL en el cas de les plaques per a rifampicina. Es van considerar aquestes concentracions per que eren 10 vegades els valors de les CIMs en fase de creixement exponencial de la soca estudiada. Els inòculs de sembra, es van estendre per la superfície de la placa mitjançant nansa de cultiu.

Es va estudiar l'evolució en l'aparició de resistències en tots els animals tractats amb ciprofloxacina i/o rifampicina soles o en combinació.

Es van incubar en aire ambient a 37° C durant 48 h.

En cas que en aquestes plaques s'aïllés alguna colònia de *S. aureus* es va confirmar l'espècie bacteriana i es va realitzar la CIM pel mètode de la macrodilució en brou segons les Normes indicades de la NCCLS.

### **3.4-Proves estadístiques.**

Es presenten els valors descriptius de les determinacions de sensibilitat de les diferents soques als antibiòtics amb els intervals de valors màxim i mínim així com els valors de la CIM<sub>50/90</sub> i CBM<sub>50/90</sub> per les diferents metodologies assajades.

Pels estudis de sinergia es presenten per a cada soca els valors d'un dels experiments de les corbes amb la representació gràfica i la taula de valors corresponent.

Els valors de l'estudi d'estabilitat es presenten també de forma descriptiva com la mitjana  $\pm$  la desviació estàndard de les tres aliquotes analitzades.

En els estudis del model animal es presenten els valors dels resultats dels cultius quantitius del rentat i del sonicat expressats com la mitjana  $\pm$  la desviació estàndard del log<sub>10</sub> ufc del segment. Les diferències en el log<sub>10</sub> ufc d'estafilococs del segment dels diferents grups de tractament van ser analitzades estadísticament mitjançant la prova Mann-Whitney U-Wilcoxon (203,204). Les comparacions de les freqüències de negativització dels catèters es van fer pel test exacte de Fisher en tots els grups de tractament. Els valors p menors o iguals a 0,05 van ser considerats significatius (204).

Pel càlcul dels diferents tests es va utilitzar el paquet estadístic SPSS (versió 8).

#### IV- RESULTATS.

#### 4.1- Estudis “in vitro” per avaluar l’activitat de diverses pautes antibiòtiques de tractament de les infeccions de catèter per *S. aureus*.

##### 4.1.1- CIM<sub>50/90</sub> i CBM<sub>50/90</sub> d’heparina i antibiòtics.

- A la taula 4.1.1.1. s’expressen els valors de CIM<sub>50</sub>, CIM<sub>90</sub> i interval de CIMs (UI/mL) d’heparina en front de 12 aïllaments clínics de *Staphylococcus aureus* obtinguts de sang de pacients amb sèpsia per catèter.

	<b>CIM<sub>50</sub></b>	<b>CIM<sub>90</sub></b>	<b>INTERVAL</b>
<b>UI/mL</b>	<b>&gt; 6000</b>	<b>&gt; 6000</b>	<b>&gt; 6000</b>

Taula 4.1.1.1.

En un interval de concentracions de 1000-6000 UI/mL, l’heparina no va demostrar capacitat d’inhibir el creixement de cap soca bacteriana. En totes les soques testades la CIM va ser superior a 6000 UI/mL.

- A la taula 4.1.1.2. s’expressen els valors de CIM<sub>50</sub>, CIM<sub>90</sub> i interval de CIMs, CBM<sub>50</sub>, CBM<sub>90</sub> i interval de CBMs (µg/mL) de vancomicina, ciprofloxacina i rifampicina en front de 12 aïllaments clínics de *Staphylococcus aureus* obtinguts de sang de pacients amb sèpsia per catèter.

<b>µg/mL</b>	<b>VANCOMICINA</b>	<b>CIPROFLOXACINA</b>	<b>RIFAMPICINA</b>
<b>CIM<sub>50</sub></b>	<b>0,25</b>	<b>0,5</b>	<b>0,004</b>
<b>CIM<sub>90</sub></b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>0,015</b>
<b>INTERVAL CIMs</b>	<b>0,12-0,5</b>	<b>0,25-1</b>	<b>0,004-0,06</b>
<b>CBM<sub>50</sub></b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>0,03</b>
<b>CBM<sub>90</sub></b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>0,06</b>
<b>INTERVAL CBMs</b>	<b>1-8</b>	<b>2-8</b>	<b>0,004-0,12</b>

Taula 4.1.1.2.

La determinació de les CIM<sub>50</sub> i CIM<sub>90</sub> pels tres antibiòtics va demostrar un estret interval de valors entre les soques, fet que també es va presentar en la determinació de la CBM<sub>50</sub> i la CBM<sub>90</sub> en fase de creixement exponencial pels tres antibiòtics en estudi, amb un interval de valors que va ser proper a l'interval de valors de la CIM.

#### 4.1.2- CIM/ CBM de vancomicina, ciprofloxacina i rifampicina en fase de creixement exponencial, estacionari i adherent.

##### A) Vancomicina.

##### Concentració Inhibitòria Míxima.

A la taula 4.1.2.1. s'expressen els valors de les CIMs de vancomicina en front de 12 aïllaments clínics de *S. aureus* obtinguts de sang de pacients amb sèpsia per catèter estudiats en fase de creixement exponencial, en fase de creixement estacionari i en fase adherent, així com els valors de les CIM<sub>50</sub> i CIM<sub>90</sub> de vancomicina de les soques en estudi, segons les diferents fases de creixement.

	CIM exponencial (µg/mL)	CIM estacionari (µg/mL)	CIM adherent (µg/mL)
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,5	0,5	0,5
<i>S. aureus</i> A7-4	0,25	1	1
<i>S. aureus</i> D22-1	0,25	0,5	0,5
<i>S. aureus</i> E6-26	0,25	0,5	1
<i>S. aureus</i> F5-34	0,5	1	0,5
<i>S. aureus</i> F7-42	0,25	0,5	2
<i>S. aureus</i> G25-31	0,25	1	2
<i>S. aureus</i> M1-2	0,25	0,5	0,5
<i>S. aureus</i> M3-18	0,12	1	1
<i>S. aureus</i> N16-2	0,25	0,5	0,5
<i>S. aureus</i> O16-3	0,5	1	0,5
<i>S. aureus</i> O20-41	0,5	1	2
CIM <sub>50</sub>	0,25	0,5	0,5
CIM <sub>90</sub>	0,5	1	2

Taula 4.1.2.1.

Les determinacions de les CIMs en fase exponencial van ser aproximadament iguals a les determinacions en fase estacionària en la majoria de les soques.

Només en una soca va incrementar en vuit vegades, mentre que en la majoria de les soques la CIM estacionària va ser el doble de la CIM exponencial.

Per altra banda, la CIM en fase adherent respecte de la fase exponencial en tres de les soques va presentar increments de fins a tres vegades i en tres de les soques es va mantenir igual.

No obstant aquestes variacions segons la fase de creixement bacterià estudiat, s'observa poca modificació dels valors de la CIM<sub>50</sub> i CIM<sub>90</sub> a vancomicina.

**Concentració Bactericida Mínima.**

A la taula 4.1.2.2. s'expressen els valors de les CBMs de vancomicina en front de 12 aïllaments clínics de *S. aureus* estudiats en fase de creixement exponencial, estacionari i en fase adherent, aix i com els valors de les CBM<sub>50</sub> i CBM<sub>90</sub> de vancomicina de les soques en estudi.

	CBM exponencial (�g/mL)	CBM estacionari (�g/mL)	CBM adherent (�g/mL)
<b><i>S. aureus</i> ATCC 29213</b>	4	4	1024
<b><i>S. aureus</i> A7-4</b>	8	16	512
<b><i>S. aureus</i> D22-1</b>	8	64	1024
<b><i>S. aureus</i> E6-26</b>	2	16	>1024
<b><i>S. aureus</i> F5-34</b>	4	8	512
<b><i>S. aureus</i> F7-42</b>	4	8	128
<b><i>S. aureus</i> G25-31</b>	4	4	1024
<b><i>S. aureus</i> M1-2</b>	8	8	1024
<b><i>S. aureus</i> M3-18</b>	1	16	128
<b><i>S. aureus</i> N16-2</b>	8	8	1024
<b><i>S. aureus</i> O16-3</b>	4	8	256
<b><i>S. aureus</i> O20-41</b>	8	64	1024
<b>CBM<sub>50</sub></b>	4	8	1024
<b>CBM<sub>90</sub></b>	8	64	1024

Taula 4.1.2.2.

La CBM de vancomicina de les soques estudiades no va augmentar en la fase estacionària respecte de l'exponencial en quatre de les soques estudiades. Per altra banda, en una soca la CBM estacionària va incrementar fins a setze vegades la CBM respecte de la determinada en fase exponencial.



En canvi, en la determinació de la CBM de la fase adherent respecte de l'exponencial es van produir increments molt més importants en un interval de 32 a més de 512 vegades els valors de la fase exponencial. Els valors de CBM obtinguts eren molt elevats, propers a la concentració utilitzada en el tractament de la sèpsia per catèter en el model animal.

Es va presentar un increment de 256 vegades el valor de la  $CBM_{50}$  de vancomicina de la fase adherent respecte de l'exponencial i en el cas de la  $CBM_{90}$  en fase adherent de 128 vegades respecte de l'exponencial.

**B) Ciprofloxacina.****Concentració Inhibitòria Míxima.**

A la taula 4.1.2.3. s'expressen els valors de les CIMs de ciprofloxacina en front de 12 aïllaments clínics de *S. aureus* estudiats en fase de creixement exponencial, estacionari i en fase adherent, així com els valors de les CIM<sub>50</sub> i CIM<sub>90</sub> de ciprofloxacina de les soques estudiades.

	CIM exponencial (µg/mL)	CIM estacionari (µg/mL)	CIM adherent (µg/mL)
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,5	0,5	0,5
<i>S. aureus</i> A7-4	0,5	1	0,5
<i>S. aureus</i> D22-1	0,5	0,5	0,5
<i>S. aureus</i> E6-26	1	1	0,5
<i>S. aureus</i> F5-34	1	0,5	0,5
<i>S. aureus</i> F7-42	0,25	1	2
<i>S. aureus</i> G25-31	0,25	1	1
<i>S. aureus</i> M1-2	1	0,5	0,5
<i>S. aureus</i> M3-18	0,5	0,5	0,5
<i>S. aureus</i> N16-2	0,5	0,5	0,5
<i>S. aureus</i> O16-3	0,5	0,5	0,5
<i>S. aureus</i> O20-41	0,5	1	1
CIM <sub>50</sub>	0,5	0,5	0,5
CIM <sub>90</sub>	1	1	1

Taula 4.1.2.3.

En cinc de les soques no es va donar cap modificació dels valors de la CIM en relació a les condicions amb què es va determinar, ja sigui fase exponencial, estacionària o adherent. Només en una soca la CIM adherent va incrementar en vuit vegades respecte de la determinada en fase exponencial.

No s'observa, doncs, cap modificació dels valors de la CIM<sub>50</sub> i de la CIM<sub>90</sub> a ciprofloxacina en relació a la fase de creixement bacterià.

### **Concentració Bactericida Mínima.**

A la taula 4.1.2.4. s'expressen els valors de les CBMs de ciprofloxacina en front de 12 aïllaments clínics de *S. aureus* estudiats en fase de creixement exponencial, estacionari i en fase adherent, així com els valors de les CBM<sub>50</sub> i CBM<sub>90</sub> de ciprofloxacina de les soques en estudi.

	<b>CBM exponencial (µg/mL)</b>	<b>CBM estacionari (µg/mL)</b>	<b>CBM adherent (µg/mL)</b>
<b><i>S. aureus</i> ATCC 29213</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>128</b>
<b><i>S. aureus</i> A7-4</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>32</b>
<b><i>S. aureus</i> D22-1</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>256</b>
<b><i>S. aureus</i> E6-26</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>32</b>
<b><i>S. aureus</i> F5-34</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>16</b>
<b><i>S. aureus</i> F7-42</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>128</b>
<b><i>S. aureus</i> G25-31</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>64</b>
<b><i>S. aureus</i> M1-2</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>32</b>
<b><i>S. aureus</i> M3-18</b>	<b>2</b>	<b>16</b>	<b>32</b>
<b><i>S. aureus</i> N16-2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>128</b>
<b><i>S. aureus</i> O16-3</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>64</b>
<b><i>S. aureus</i> O20-41</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>32</b>
<b>CBM<sub>50</sub></b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>32</b>
<b>CBM<sub>90</sub></b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>128</b>

Taula 4.1.2.4.

La CBM en fase estacionària de ciprofloxacina de les soques estudiades es va mantenir gairebé sense modificacions o amb variacions mínimes en la majoria de les soques respecte de l'exponencial. En només una de les soques

el valor de la CBM va incrementar fins a vuit vegades. En cinc de les soques va incrementar en dues vegades, en tres es va mantenir invariable i en tres va disminuir a la meitat.

En el cas de la fase adherent respecte de la fase exponencial els increments de la CBM no van ser tant importants com en el cas de la vancomicina i van oscil·lar entre dues i 32 vegades els valors obtinguts respecte de la fase exponencial.

En tres soques els increments van ser de quatre vegades la CBM exponencial i en tres soques els increments van ser de 32 vegades respecte de la CBM exponencial.

Es va presentar un increment de quatre vegades de la  $CBM_{50}$  adherent de ciprofloxacina respecte de la fase estacionària i de la fase de creixement exponencial. La  $CBM_{90}$  en fase adherent va incrementar fins a 16 vegades respecte de l'exponencial.

**C) Rifampicina.****Concentració Inhibitòria Mínima.**

A la taula 4.1.2.5. s'expressen els valors de les CIMs de rifampicina en front de 12 aïllaments clínics de *S. aureus* estudiats en fase de creixement exponencial, estacionari i en fase adherent, així com els valors de les CIM<sub>50</sub> i CIM<sub>90</sub> de rifampicina de les soques en estudi.

	CIM exponencial (µg/mL)	CIM estacionari (µg/mL)	CIM adherent (µg/mL)
<b><i>S. aureus</i> ATCC 29213</b>	<b>0,004</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,001</b>
<b><i>S. aureus</i> A7-4</b>	<b>0,004</b>	<b>0,008</b>	<b>0,5</b>
<b><i>S. aureus</i> D22-1</b>	<b>0,004</b>	<b>0,001</b>	<b>0,002</b>
<b><i>S. aureus</i> E6-26</b>	<b>0,004</b>	<b>0,001</b>	<b>0,25</b>
<b><i>S. aureus</i> F5-34</b>	<b>0,001</b>	<b>0,5</b>	<b>2</b>
<b><i>S. aureus</i> F7-42</b>	<b>0,001</b>	<b>0,008</b>	<b>0,5</b>
<b><i>S. aureus</i> G25-31</b>	<b>0,004</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,001</b>
<b><i>S. aureus</i> M1-2</b>	<b>0,015</b>	<b>0,0005</b>	<b>0,002</b>
<b><i>S. aureus</i> M3-18</b>	<b>0,004</b>	<b>0,0005</b>	<b>0,0005</b>
<b><i>S. aureus</i> N16-2</b>	<b>0,004</b>	<b>0,0005</b>	<b>0,0005</b>
<b><i>S. aureus</i> O16-3</b>	<b>0,06</b>	<b>0,002</b>	<b>0,004</b>
<b><i>S. aureus</i> O20-41</b>	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>
<b>CIM<sub>50</sub></b>	<b>0,004</b>	<b>0,001</b>	<b>0,002</b>
<b>CIM<sub>90</sub></b>	<b>0,015</b>	<b>0,008</b>	<b>0,5</b>

Taula 4.1.2.5.

En el cas de la CIM en fase adherent es va produir una disminució de la CIM en set de les soques estudiades, respecte de la determinada en fase exponencial. En quatre de les soques es van produir increments d'entre 125 i 2000 vegades el valor de la CIM en fase de creixement exponencial.

En conjunt, es va presentar poca modificació dels valors de la CIM<sub>50</sub> adherent respecte de l'exponencial mentre que la CIM<sub>90</sub> adherent va incrementar en més de 32 vegades respecte de la determinada en fase de creixement exponencial.

**Concentració Bactericida Mínima.**

A la taula 4.1.2.6. s'expressen els valors de les CBMs de rifampicina en front de 12 aïllaments clínics de *S. aureus* estudiats en fase de creixement exponencial, estacionari i en fase adherent, aix i com els valors de les CBM<sub>50</sub> i CBM<sub>90</sub> de rifampicina de les soques en estudi.

	<b>CBM exponencial (�g/mL)</b>	<b>CBM estacionari (�g/mL)</b>	<b>CBM adherent (�g/mL)</b>
<b><i>S. aureus</i> ATCC 29213</b>	<b>0,004</b>	<b>0,25</b>	<b>16</b>
<b><i>S. aureus</i> A7-4</b>	<b>0,03</b>	<b>2</b>	<b>128</b>
<b><i>S. aureus</i> D22-1</b>	<b>0,03</b>	<b>0,25</b>	<b>4</b>
<b><i>S. aureus</i> E6-26</b>	<b>0,06</b>	<b>1</b>	<b>16</b>
<b><i>S. aureus</i> F5-34</b>	<b>0,06</b>	<b>2</b>	<b>16</b>
<b><i>S. aureus</i> F7-42</b>	<b>0,12</b>	<b>2</b>	<b>128</b>
<b><i>S. aureus</i> G25-31</b>	<b>0,008</b>	<b>0,5</b>	<b>2</b>
<b><i>S. aureus</i> M1-2</b>	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>	<b>4</b>
<b><i>S. aureus</i> M3-18</b>	<b>0,06</b>	<b>0,12</b>	<b>2</b>
<b><i>S. aureus</i> N16-2</b>	<b>0,004</b>	<b>0,12</b>	<b>1</b>
<b><i>S. aureus</i> O16-3</b>	<b>0,06</b>	<b>0,25</b>	<b>2</b>
<b><i>S. aureus</i> O20-41</b>	<b>0,06</b>	<b>0,12</b>	<b>8</b>
<b>CBM<sub>50</sub></b>	<b>0,03</b>	<b>0,25</b>	<b>4</b>
<b>CBM<sub>90</sub></b>	<b>0,06</b>	<b>2</b>	<b>128</b>

Taula 4.1.2.6.

S'observen increments de la CBM més importants en la fase estacionària respecte de l'exponencial que en els dos antibiòtics anteriors. En vuit de les soques estudiades els increments observats de la CBM van ser almenys de vuit vegades fins a un màxim de 64 vegades en tres de les soques estudiades.

En el cas dels valors de la CBM adherent respecte de l'exponencial, es van observar increments d'entre 125 i 4000 vegades el valor de la CBM exponencial en la majoria de les soques. En dues de les soques l'increment va ser de fins a 4000 vegades el valor de la CBM exponencial.

Es va presentar un increment de vuit vegades la  $CBM_{50}$  en fase de creixement estacionari respecte de l'exponencial i, més important, en més de 125 vegades, de la  $CBM_{50}$  adherent respecte de l'exponencial. Pel que fa a la  $CBM_{90}$  adherent respecte de la determinada en fase de creixement exponencial va incrementar fins en més de 2000 vegades.



#### **4.1.3- Avaluació “in vitro” de l’activitat antimicrobiana de combinacions de vancomicina o ciprofloxacina amb heparina o rifampicina.**

La combinació de vancomicina amb heparina va produir una disminució d’entre 0,1 i 1  $\log_{10}$  ufc/mL dels recomptes bacterians respecte de la vancomicina sola. L’heparina no va presentar cap efecte sobre el creixement bacterià ni a les quatre ni a les 24 h.

La combinació de ciprofloxacina amb heparina va tenir un efecte indiferent ja que o bé va mantenir el mateix efecte que la ciprofloxacina sola o bé va produir un increment dels recomptes bacterians que oscil.laven entre 0,1  $\log_{10}$  ufc/mL (soca *S. aureus* D22-1) a 1,4  $\log_{10}$  ufc/mL (soca *S. aureus* ATCC 29213) respecte de la ciprofloxacina sola.

En conjunt, l’associació de vancomicina o ciprofloxacina amb heparina va tenir un efecte indiferent.

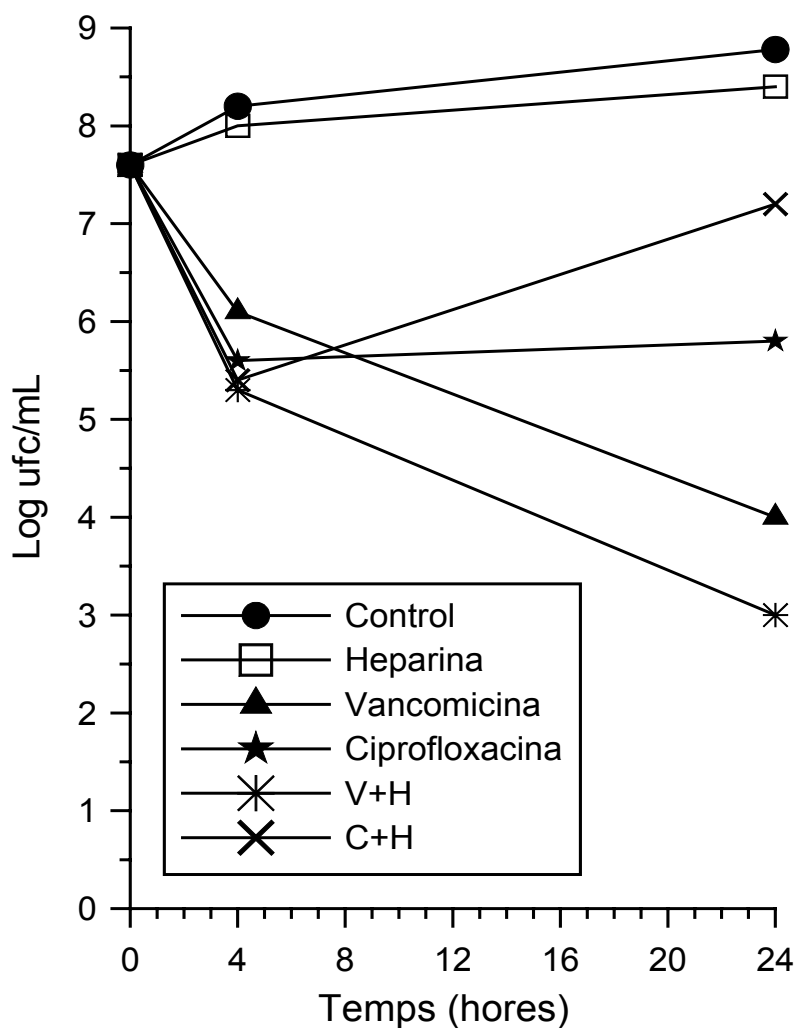
Pel que fa als resultats obtinguts de la combinació de la vancomicina amb rifampicina, aquesta va produir un lleuger increment de 0,36  $\log_{10}$  ufc/mL en una de les soques mentre que en quatre d’elles va tenir disminucions dels recomptes bacterians de fins a  $-1,1 \log_{10}$  ufc/mL respecte dels que havia aconseguit la rifampicina sola.

La combinació de ciprofloxacina amb rifampicina va presentar una disminució dels recomptes bacterians en una de les soques de fins a  $-1,12 \log_{10}$  ufc/mL i increments en cinc de les soques de fins a 1,2  $\log_{10}$  ufc/mL respecte dels que havia aconseguit la ciprofloxacina sola.

En conjunt, podem veure, doncs, com la combinació de la vancomicina o de la ciprofloxacina amb la rifampicina va tenir un efecte indiferent.

##### **4.1.3.1- Vancomicina o ciprofloxacina i heparina.**

**Soca *S. aureus* ATCC 29213.-** L’activitat de la vancomicina, ciprofloxacina i heparina soles i en combinació es pot veure a la figura 4.1.3.1.1. A la taula corresponent s’expressen els recomptes bacterians com a  $\log_{10}$  ufc/mL.



Temps (h)	Control	Heparina 2500 UI/mL (H)	Vancomicina 0,5 µg/mL (V)	Ciprofloxacina 0,5 µg/mL (C)	V+H	C+H
0	7,6	7,6	7,6	7,6	7,6	7,6
4	8,2	8	6,1	5,6	5,3	5,4
24	8,78	8,4	4	5,8	3	7,2

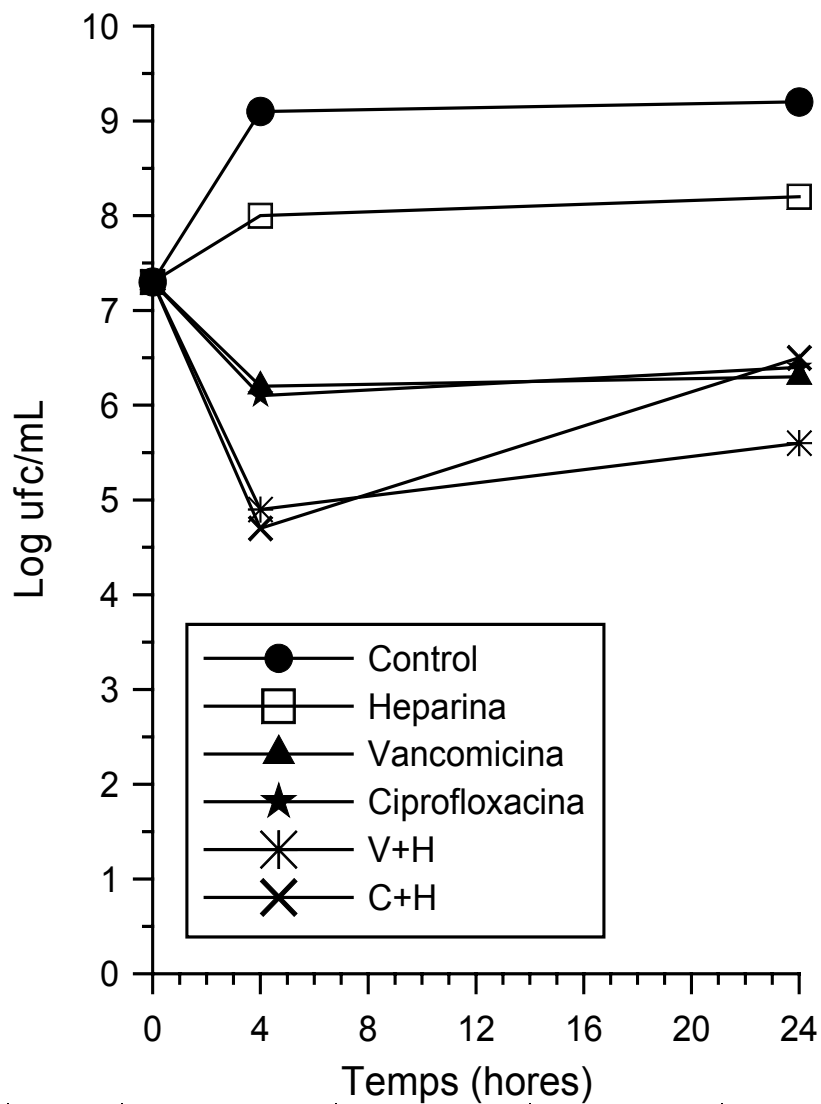
Figura 4.1.3.1.1. Corba de letalitat i taula de valors de l'estudi de la soca *S. aureus* ATCC 29213 amb heparina. Les combinacions amb heparina estan estudiades a les mateixes concentracions que l'heparina o l'antibiòtic sols.

La corba de letalitat va demostrar que:

- La combinació de vancomicina amb heparina va produir una disminució de 1  $\log_{10}$  ufc/mL dels recomptes bacterians respecte de la vancomicina sola.

- L'heparina no va presentar cap efecte sobre el creixement bacterià ni a les quatre ni a les 24 h.
- La combinació de ciprofloxacina amb heparina va tenir un increment de  $1,4 \log_{10}$  ufc/mL els recomptes bacterians respecte de la ciprofloxacina sola.
- En conjunt, l'associació de vancomicina o ciprofloxacina amb heparina va tenir un efecte indiferent.

**Soca *S. aureus* D22-1.** L'activitat de la vancomicina, ciprofloxacina i heparina soles i en combinació es pot veure a la figura 4.1.3.1.2. A la taula corresponent s'expressen els recomptes bacterians com a  $\log_{10}$  ufc/mL.



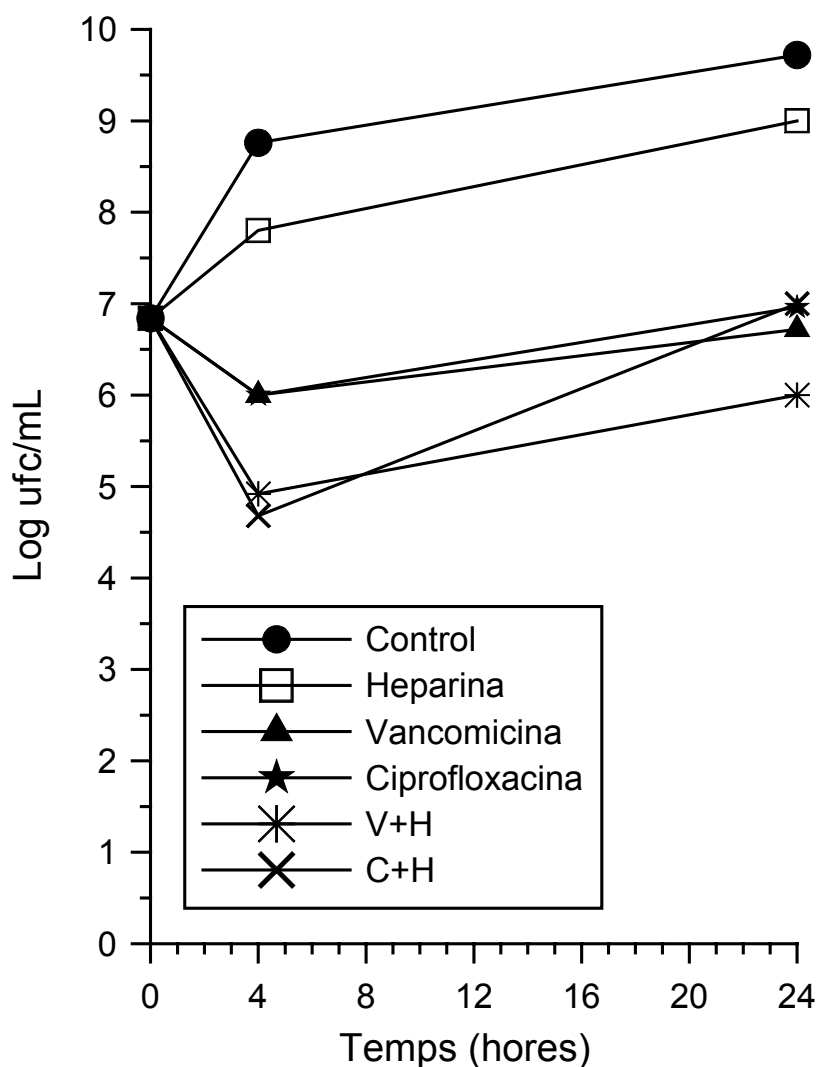
Temps (h)	Control	Heparina 2500 UI/mL (H)	Vancomicina 0,25 µg/mL (V)	Ciprofloxacina 0,5 µg/mL (C)	V+H	C+H
0	7,3	7,3	7,3	7,3	7,3	7,3
4	9,1	8	6,2	6,1	4,9	4,7
24	9,2	8,2	6,3	6,4	5,6	6,5

Figura 4.1.3.1.2. Corba de letalitat i taula de valors de l'estudi de la soca *S. aureus* D22-1. Les combinacions amb heparina estan estudiades a les mateixes concentracions que l'heparina o l'antibiòtic sols.

La corba de letalitat va demostrar que:

- La combinació de vancomicina amb heparina va produir una disminució de  $0,7 \log_{10}$  ufc/mL dels recomptes bacterians a les 24 h respecte de la vancomicina sola.
- La combinació de ciprofloxacina amb heparina va incrementar en  $0,1 \log_{10}$  ufc/mL els recomptes bacterians respecte de la ciprofloxacina sola.
- En conjunt, l'associació de vancomicina o ciprofloxacina amb heparina va tenir un efecte indiferent.

**Soca *S. aureus* G25-31.**- L'activitat de la vancomicina, ciprofloxacina i heparina soles i en combinació es pot veure a la figura 4.1.3.1.3. A la taula corresponent s'expressen els recomptes bacterians com a  $\log_{10}$  ufc/mL.



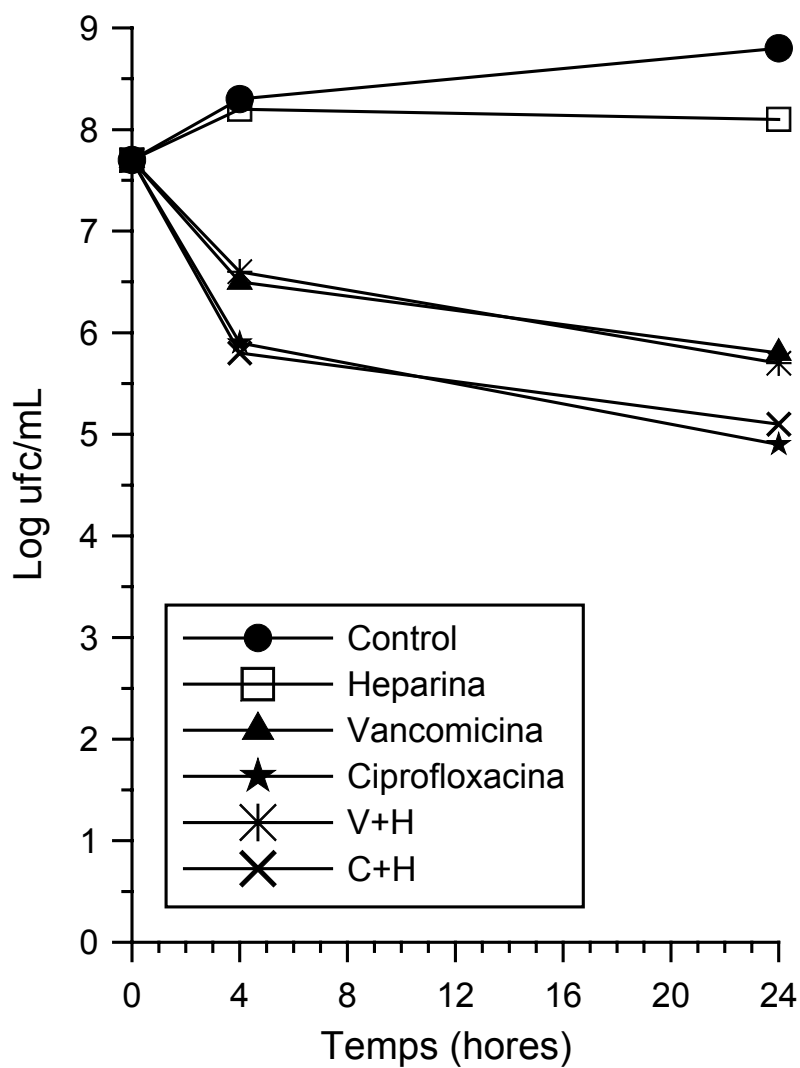
Temps (h)	Control	Heparina 2500 UI/mL (H)	Vancomicina 0,25 µg/mL (V)	Ciprofloxacina 0,25 µg/mL (C)	V+H	C+H
0	6,84	6,84	6,84	6,84	6,84	6,84
4	8,76	7,8	6	6	4,92	4,68
24	9,72	9	6,72	6,96	6	7

Figura 4.1.3.1.3. Corba de letalitat i taula de valors de l'estudi de la soca *S. aureus* G25-31. Les combinacions amb heparina estan estudiades a les mateixes concentracions que l'heparina o l'antibiòtic sols.

La corba de letalitat va demostrar que:

- La combinació de vancomicina amb heparina va produir una disminució de  $0,72 \log_{10}$  ufc/mL dels recomptes bacterians a les 24 h respecte de la disminució de la vancomicina sola.
- La combinació de ciprofloxacina amb heparina va tenir pràcticament el mateix efecte que el que va presentar la ciprofloxacina sola, amb un increment de  $0,04 \log_{10}$  ufc/mL dels recomptes bacterians.
- En conjunt, l'associació de vancomicina o ciprofloxacina amb heparina va tenir un efecte indiferent.

**Soca *S. aureus* N16-2.** L'activitat de la vancomicina, ciprofloxacina i heparina soles i en combinació es pot veure a la figura 4.1.3.1.4. A la taula corresponent s'expressen els recomptes bacterians com a  $\log_{10}$  ufc/mL.



Temps (h)	Control	Heparina 2500 UI/mL (H)	Vancomicina 0,25 µg/mL (V)	Ciprofloxacina 0,5 µg/mL (C)	V+H	C+H
0	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7
4	8,3	8,2	6,5	5,9	6,6	5,8
24	8,8	8,1	5,8	4,9	5,7	5,1

Figura 4.1.3.1.4. Corba de letalitat i taula de valors de l'estudi de la soca *S. aureus* N16-2. Les combinacions amb heparina estan estudiades a les mateixes concentracions que l'heparina o l'antibiòtic soles.

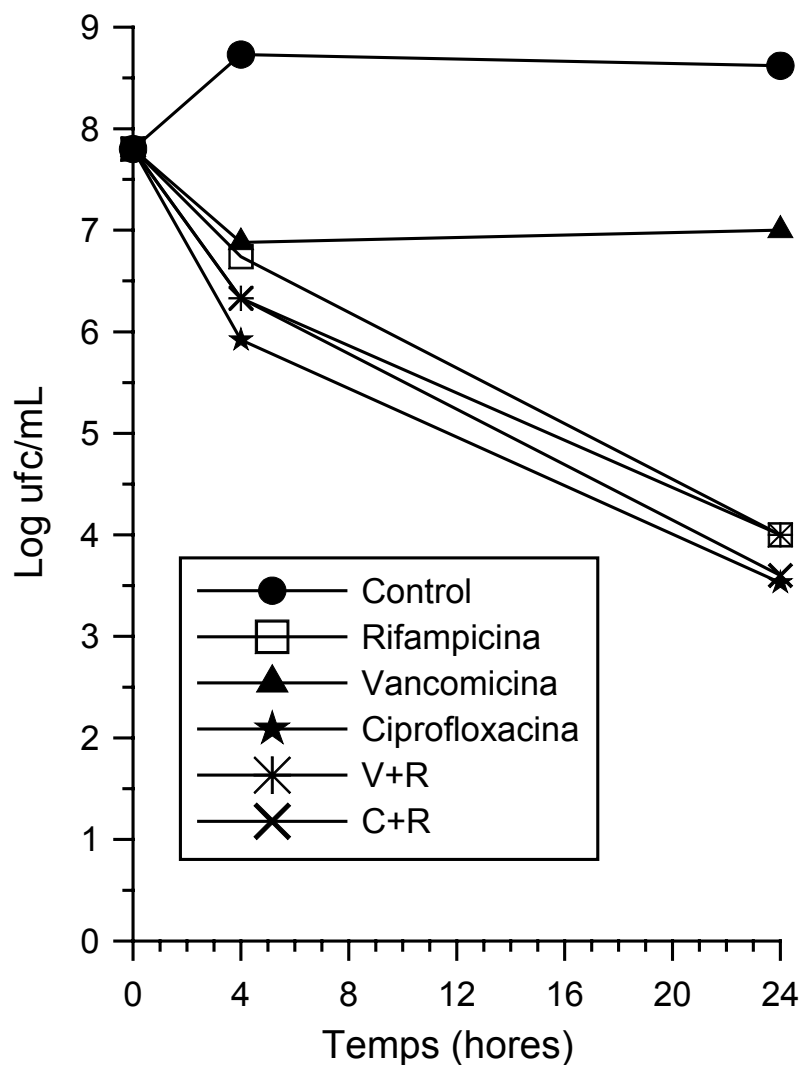


La corba de letalitat va demostrar que:

- La combinació de vancomicina amb heparina va produir una disminució de  $0,1 \log_{10}$  ufc/mL dels recomptes bacterians a les 24 h respecte de l'efecte de la vancomicina sola.
  
- La combinació de ciprofloxacina amb heparina va produir un increment de  $0,2 \log_{10}$  ufc/mL en els recomptes bacterians respecte de la ciprofloxacina sola.
  
- En conjunt, l'associació de vancomicina o ciprofloxacina amb heparina va tenir un efecte indiferent.

#### 4.1.3.2- Vancomicina o ciprofloxacina i rifampicina.

**Soca *S. aureus* ATCC 29213.** L'activitat de la vancomicina, ciprofloxacina i rifampicina soles i en associació pot veure's a la figura 4.1.3.2.1. A la taula corresponent s'expressen els recomptes bacterians com a  $\log_{10}$  ufc/mL.



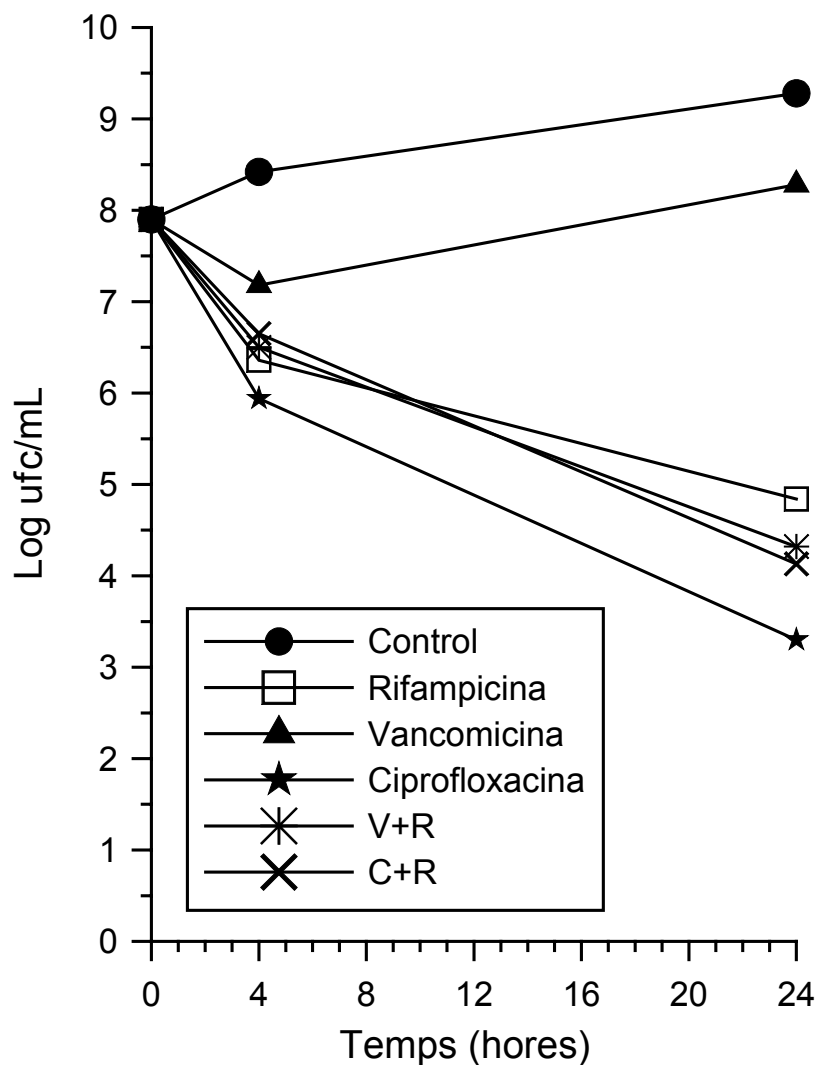
Temps (h)	Control	Rifampicina 0,004 $\mu\text{g/mL}$ (R)	Vancomicina 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (V)	Ciprofloxacina 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (C)	V+R	C+R
0	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8
4	8,73	6,74	6,88	5,92	6,33	6,33
24	8,62	4	7	3,53	4	3,6

Figura 4.1.3.2.1. Corba de letalitat i taula de valors de l'estudi de la soca *S. aureus* ATCC 29213. Les combinacions amb rifampicina estan estudiades a les mateixes concentracions que els antibiòtics sols.

La corba de letalitat va demostrar que:

- La combinació de vancomicina amb rifampicina va presentar a les 24 h el mateix efecte que la rifampicina sola.
  
- La combinació de ciprofloxacina amb rifampicina va presentar el mateix efecte que la ciprofloxacina sola, ja que va incrementar en  $0,07 \log_{10}$  ufc/mL els recomptes bacterians que s'havien obtingut amb la ciprofloxacina sola a les 24 h. Respecte de rifampicina sola, l'associació va disminuir en  $0,4 \log_{10}$  ufc/mL l'efecte que aquest antibiòtic havia tingut sol.
  
- En conjunt, la combinació de vancomicina o ciprofloxacina amb rifampicina va tenir un efecte indiferent.

**Soca *S. aureus* D22-1.**- L'activitat de la vancomicina, de ciprofloxacina i rifampicina soles i en associació pot veure's a la figura 4.1.3.2.2. A la taula corresponent s'expressen els recomptes bacterians com a  $\log_{10}$  ufc/mL.



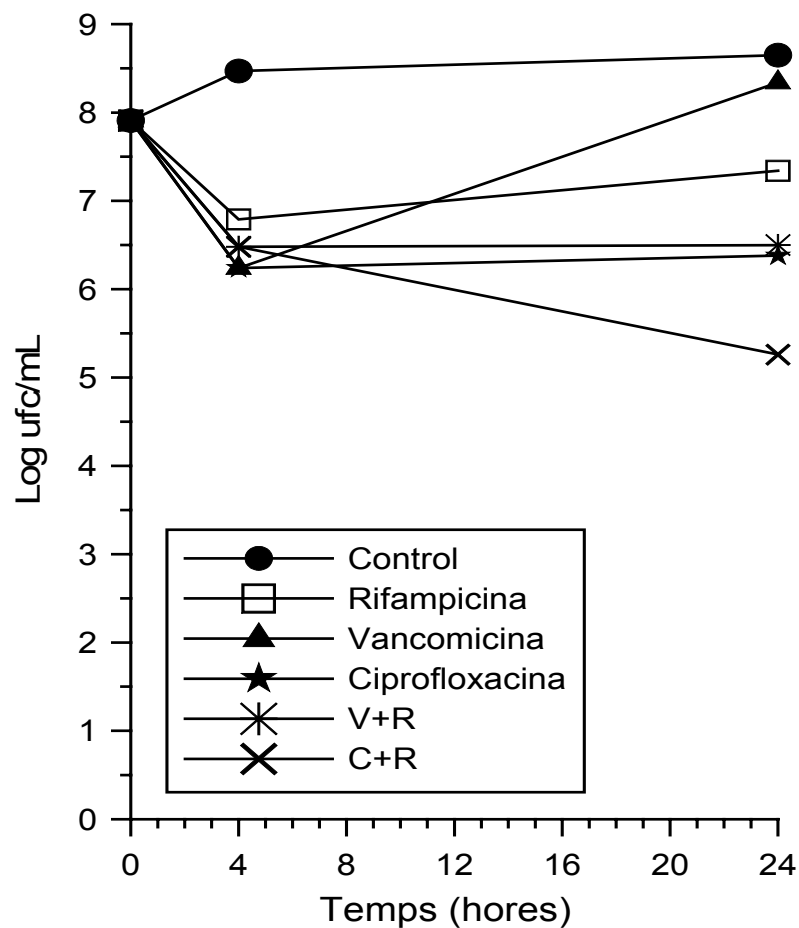
Temps (h)	Control	Rifampicina 0,004 µg/mL (R)	Vancomicina 0,25 µg/mL (V)	Ciprofloxacina 0,5 µg/mL (C)	V+R	C+R
0	7,9	7,9	7,9	7,9	7,9	7,9
4	8,42	6,36	7,18	5,94	6,5	6,65
24	9,28	4,84	8,28	3,3	4,32	4,13

Figura 4.1.3.2.2. Corba de letalitat i taula de valors de l'estudi de la soca *S. aureus* D22-1. Les combinacions amb rifampicina estan estudiades a les mateixes concentracions que els antibiòtics sols.

La corba de letalitat va demostrar que:

- La combinació de vancomicina amb rifampicina va produir una disminució de  $0,52 \log_{10}$  ufc/mL dels recomptes bacterians a les 24 h respecte de la disminució que va presentar la rifampicina sola.
- La combinació de ciprofloxacina amb rifampicina va incrementar en  $0,83 \log_{10}$  ufc/mL l'inòcul inicial respecte dels recomptes que va presentar la ciprofloxacina sola, que va ser l'antibiòtic que aïlladament va presentar una major disminució dels recomptes bacterians a les 24 h.
- En conjunt, la combinació de vancomicina o ciprofloxacina amb rifampicina va tenir un efecte indiferent.

**Soca *S. aureus* G25-31.**- L'activitat de la vancomicina, de ciprofloxacina i de la rifampicina soles o en associació pot veure's a la figura 4.1.3.2.3. A la taula corresponent s'expressen els recomptes bacterians com a  $\log_{10}$  ufc/mL.



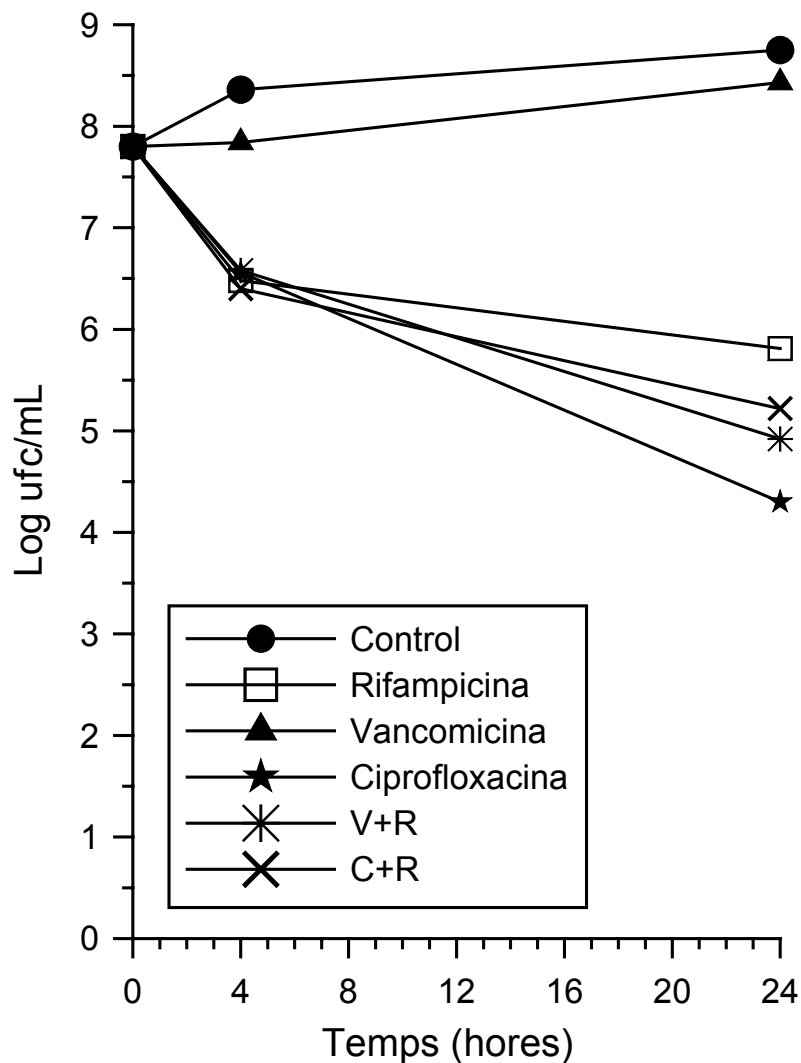
Temps (h)	Control	Rifampicina 0,004 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (R)	Vancomicina 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (V)	Ciprofloxacina 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C)	V+R	C+R
0	7,91	7,91	7,91	7,91	7,91	7,91
4	8,47	6,79	6,24	6,24	6,48	6,48
24	8,65	7,34	8,34	6,38	6,5	5,26

Figura 4.1.3.2.3. Corba de letalitat i taula de valors de l'estudi de la soca *S. aureus* G25-31. Les combinacions amb rifampicina estan estudiades a les mateixes concentracions que els antibiòtics sols.

La corba de letalitat va demostrar que:

- La combinació de vancomicina amb rifampicina va presentar una disminució dels recomptes bacterians a les 24 h de 0,84  $\log_{10}$  ufc/mL major que la presentada per la rifampicina sola.
- La combinació de ciprofloxacina amb rifampicina va disminuir en 1,12  $\log_{10}$  ufc/mL els recomptes bacterians respecte de la ciprofloxacina sola, que va ser l'antibiòtic que aïlladament va presentar la major disminució del recomptes bacterians.
- En conjunt, la combinació de vancomicina o ciprofloxacina amb rifampicina va tenir un efecte indiferent.

**Soca *S. aureus* M1-2.**- L'activitat de la vancomicina, ciprofloxacina i rifampicina soles i en associació pot veure's a la figura 4.1.3.2.4. A la taula corresponent s'expressen els recomptes bacterians com a  $\log_{10}$  ufc/mL.



Temps (h)	Control	Rifampicina 0,015 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (R)	Vancomicina 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (V)	Ciprofloxacina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C)	V+R	C+R
0	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8
4	8,36	6,48	7,84	6,56	6,58	6,4
24	8,75	5,81	8,43	4,3	4,92	5,22

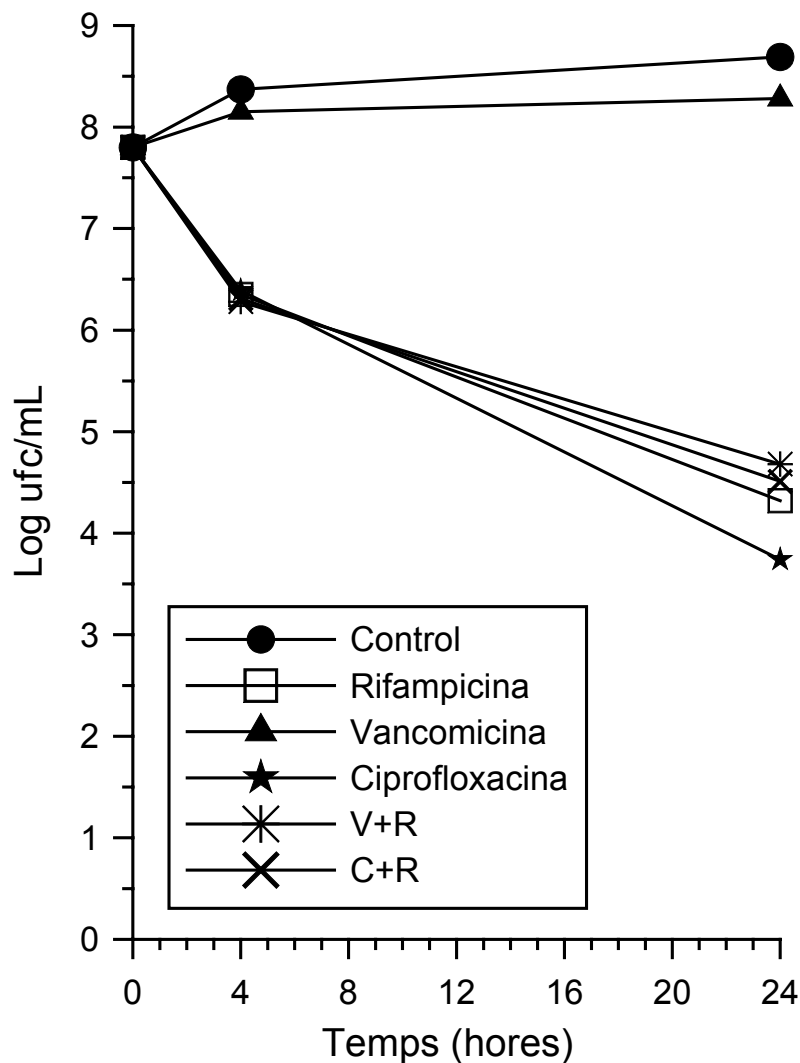
Figura 4.1.3.2.4. Corba de letalitat i taula de valors de l'estudi de la soca *S. aureus* M1-2. Les combinacions amb rifampicina estan estudiades a les mateixes concentracions que els antibiòtics soles.



La corba de letalitat va demostrar que:

- La combinació de vancomicina amb rifampicina va disminuir 0,89  $\log_{10}$  ufc/mL més que la rifampicina sola els recomptes bacterians a les 24 h.
  
- La combinació de ciprofloxacina amb rifampicina va incrementar en 0,92  $\log_{10}$  ufc/mL els recomptes bacterians de la ciprofloxacina sola que va ser l'antibiòtic que a les 24 h va presentar la major disminució dels recomptes bacterians.
  
- En conjunt, l'associació de vancomicina amb rifampicina o ciprofloxacina amb rifampicina va ser indiferent a les 24 h.

**Soca *S. aureus* N16-2.-** L'activitat de la vancomicina, ciprofloxacina i rifampicina soles i en associació pot veure's a la figura 4.1.3.2.5. A la taula corresponent s'expressen els recomptes bacterians com a  $\log_{10}$  ufc/mL.



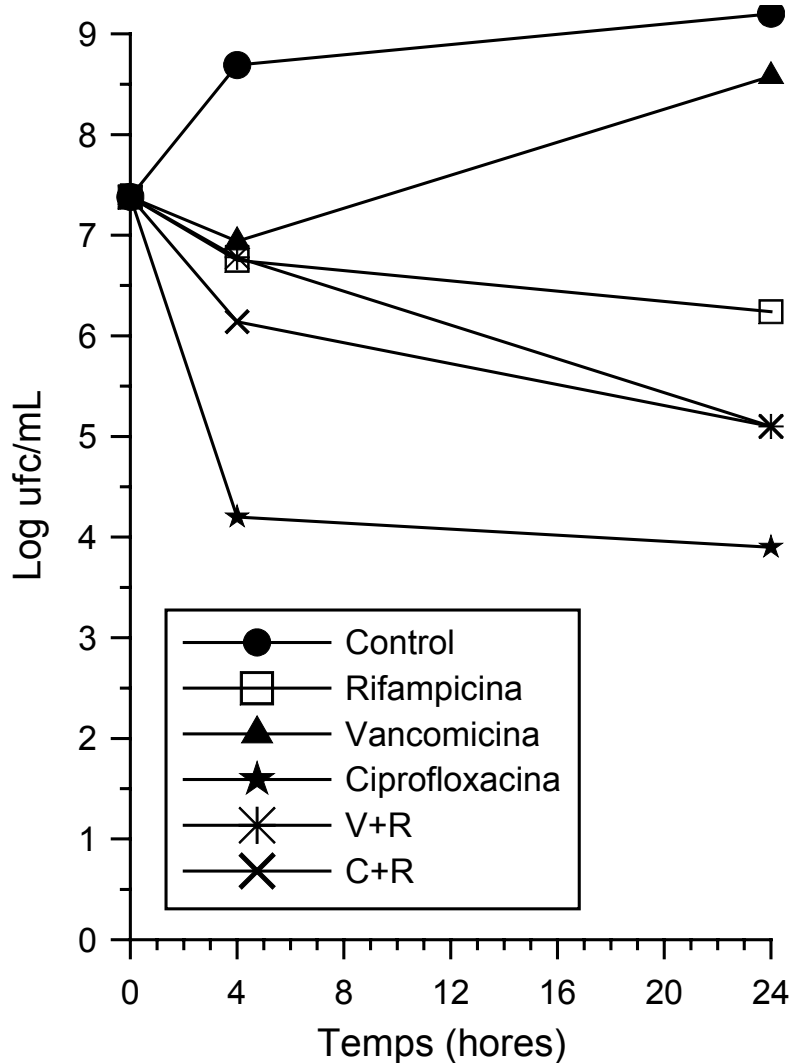
Temps (h)	Control	Rifampicina 0,004 $\mu\text{g/mL}$ (R)	Vancomicina 0,25 $\mu\text{g/mL}$ (V)	Ciprofloxacina 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (C)	V+R	C+R
0	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8
4	8,37	6,35	8,15	6,39	6,28	6,31
24	8,69	4,32	8,28	3,74	4,68	4,51

Figura 4.1.3.2.5. Corba de letalitat i taula de valors de l'estudi de la soca *S. aureus* N16-2. Les combinacions amb rifampicina estan estudiades a les mateixes concentracions que els antibiòtics soles.

La corba de letalitat va demostrar que:

- La combinació de vancomicina amb rifampicina va empitjorar el resultat que havia presentat la rifampicina a les 24 h en incrementar en 0,36  $\log_{10}$  ufc/mL els recomptes bacterians respecte de la rifampicina sola.
- La combinació de ciprofloxacina amb rifampicina va incrementar en 0,77  $\log_{10}$  ufc/mL els recomptes bacterians a les 24 h respecte de la disminució que havia presentat la ciprofloxacina sola, que va ser l'antibiòtic que aïlladament va presentar major disminució dels recomptes bacterians.
- En conjunt, la combinació de vancomicina o ciprofloxacina amb rifampicina va tenir un efecte indiferent.

**Soca *S. aureus* O20-41.**- L'activitat de la vancomicina, ciprofloxacina i rifampicina soles i en associació pot veure's a la figura 4.1.3.2.6. A la taula corresponent s'expressen els recomptes bacterians com a  $\log_{10}$  ufc/mL.



Temps (h)	Control	Rifampicina 0,004 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (R)	Vancomicina 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (V)	Ciprofloxacina 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C)	V+R	C+R
0	7,38	7,38	7,38	7,38	7,38	7,38
4	8,69	6,75	6,94	4,2	6,78	6,14
24	9,2	6,24	8,58	3,9	5,1	5,1

Figura 4.1.3.2.6. Corba de letalitat i taula de valors de l'estudi de la soca *S. aureus* O20-41. Les combinacions amb rifampicina estan estudiades a les mateixes concentracions que els antibiòtics sols.

La corba de letalitat va demostrar que:

- La combinació de vancomicina amb rifampicina va disminuir en 1,14  $\log_{10}$  ufc/mL els recomptes bacterians a les 24 h respecte de la rifampicina sola.
- La combinació de ciprofloxacina amb rifampicina va incrementar en 1,2  $\log_{10}$  ufc/mL els recomptes bacterians a les 24 h respecte de la disminució que va aconseguir la ciprofloxacina sola, que va ser l'antibiòtic que aïlladament va presentar la major disminució dels recomptes bacterians.
- En conjunt, l'associació d'antibiòtics va tenir un efecte indiferent també en aquesta soca.

## 4.2- Avaluació de l'estabilitat de les combinacions de vancomicina o ciprofloxacina amb heparina o rifampicina.

### 4.2.1- Estabilitat de vancomicina o ciprofloxacina amb heparina.

A la taula 4.2.1. s'expressen les concentracions de vancomicina (2000 µg/mL) i ciprofloxacina (1000 µg/mL) en una solució amb heparina (2500 UI/mL) dins d'un tub de vidre a 37° C en aire ambient a diferents intervals de temps. Els resultats que es presenten són la mitjana ± la desviació estàndard de les tres aliquotes analitzades simultàniament.

	<b>0 hores</b>	<b>24 hores</b>	<b>48 hores</b>	<b>72 hores</b>
<b>Vancomicina<sup>1</sup></b> (amb heparina)	2096 ± 74	1917 ± 90	1841 ± 18	1967 ± 67
<b>Ciprofloxacina<sup>2</sup></b> (amb heparina)	1010 ± 20	970 ± 40	1045 ± 50	1045 ± 45

Taula 4.2.1.

<sup>1</sup>Pel mètode de l'immunoassaig.

<sup>2</sup>Pel mètode del bioassaig.

Vancomicina i ciprofloxacina van ser estables en una solució amb heparina al llarg del període d'observació de 72 h amb una variació inferior al 10% respecte dels valors inicials.

A més, cal remarcar que en cap de les mostres es va observar precipitació macroscòpica.

#### 4.2.2- Estabilitat de vancomicina, ciprofloxacina i rifampicina.

A la taula 4.2.2. s'expressen les concentracions de vancomicina (2000 µg/mL) i ciprofloxacina (2000 µg/mL) soles i en combinació amb rifampicina (3000 µg/mL) dins d'un tub de vidre a 37° C en aire ambient en una solució sense heparina a diferents intervals de temps. Els resultats que es presenten són la mitjana ± la desviació estàndard de les tres aliquotes analitzades simultàniament.

	0 hores	24 hores	48 hores	72 hores
<b>Rifampicina<sup>3</sup></b>	2925 ± 32	2724 ± 50	2430 ± 51	2218 ± 64
<b>Vancomicina<sup>1</sup></b>	2018 ± 60	1980 ± 75	1910 ± 62	1892 ± 35
<b>Vancomicina<sup>1</sup></b>	1975 ± 65	1930 ± 67	1848 ± 34	1840 ± 46
<b>Rifampicina<sup>3</sup></b>	2980 ± 51	2632 ± 55	2600 ± 40	2580 ± 32
<b>Ciprofloxacina<sup>2</sup></b>	1950 ± 30	1900 ± 42	1875 ± 60	1870 ± 41
<b>Ciprofloxacina<sup>2</sup></b>	1960 ± 12	1920 ± 35	1915 ± 65	1880 ± 37
<b>Rifampicina<sup>3</sup></b>	3027 ± 31	2414 ± 45	2410 ± 38	2234 ± 62

Taula 4.2.2.

<sup>1</sup>Pel mètode de l'immuoassaig.

<sup>2</sup>Pel mètode del bioassaig.

<sup>3</sup>Pel mètode de cromatografia líquida en fase reversa.

Vancomicina i ciprofloxacina van ser estables en combinació amb rifampicina al llarg del període d'observació de 72 h amb una variació inferior al 10% respecte dels valors inicials.

La rifampicina es mantenia estable però amb una disminució aproximada del 15% amb vancomicina i fins del 25% dels valors inicials sola i en combinació amb ciprofloxacina.

### 4.3- Estudis en el model animal d'infecció per catèter.

#### 4.3.1- Estandardització del model animal.

A la taula 4.3.1. s'expressen els resultats dels experiments d'estandardització del model animal de sèpsia per catèter produïda per *S. aureus* (soca N16-2) amb 20 conills New Zealand. Resultats dels estudis microbiològics després de sacrificar els animals a les 18 i 48 h des de què es va provocar la infecció.

	<b>n morts/ n total</b>	<b>HQT/HQP<sup>1</sup></b>	<b>Rodatge<sup>2</sup> n negatiu/ n total</b>	<b>Rentat<sup>2,3</sup> Mitjana ± DS (log<sub>10</sub> ufc)</b>	<b>Sonicat<sup>2,3</sup> Mitjana ± DS (log<sub>10</sub> ufc)</b>
<b>18 hores</b>	0/ 10	10/ 10	0/ 10	4,1 ± 1,2	4,5 ± 1,1
<b>48 hores</b>	2/ 10	8/ 8	0/ 8	4,0 ± 1,5	4,1 ± 1,3

Taula 4.3.1.

<sup>1</sup> Cultius de la sang obtinguda transcatèter (HQT) amb recomptes bacterians superiors 4 vegades a la sang obtinguda a través de vena perifèrica (HQP).

<sup>2</sup> Negatiu es va considerar com un número d'ufc < a 15 pel cultiu semiquantitatiu. Es va considerar un resultat negatiu del cultiu quantitatiu si el número total d'ufc era menor de 40 pel rentat (1,6 log<sub>10</sub> ufc) o de 80 pel sonicat (1,9 log<sub>10</sub> ufc).

<sup>3</sup> Els resultats dels cultius quantitatius estan expressats com la mitjana ± DS del log<sub>10</sub> ufc del segment.

Mitjançant el mètode d'infecció endoluminal, la superfície interna i també l'externa del catèter es van colonitzar amb recomptes bacterians elevats que causen bacterièmia als conills. Tots els animals estaven infectats amb puntes de catèter amb cultiu positiu pel mètode semiquantitatiu i quantitatiu a les 18 h i a les 48 h de la infecció.



#### 4.3.2- Estudis d'eficàcia terapèutica mitjançant l'antibiòtic-lock en el model de sèpsia per catèter.

##### 4.3.2.1- Eficàcia de l'heparina, vancomicina i ciprofloxacina soles o en combinació.

###### \* Resultats de la soca *S. aureus* N16-2.

A la taula 4.3.2.1.1. s'expressen els resultats del tractament de sèpsia per catèter produïda per *S. aureus* (soca N16-2) en un model animal. Els animals van ser sacrificats 24 h després d'iniciar el tractament mitjançant la tècnica de l'antibiòtic-lock. Les concentracions administrades van ser: heparina 2500 UI/mL, vancomicina 2000 µg/mL i ciprofloxacina 1000 µg/mL.

		Rodatge	Rentat		Sonicat	
Grups de tractament	n morts/ n total	n negatius/ n total <sup>1</sup>	n negatius/ n total <sup>2</sup>	Mitjana ± DS <sup>3</sup> (log <sub>10</sub> ufc)	n negatius/ n total <sup>2</sup>	Mitjana ± DS <sup>3</sup> (log <sub>10</sub> ufc)
Control	0/ 14	0/ 14	0/ 14	4,40 ± 0,81	0/ 14	4,59 ± 0,71
Heparina	0/ 8	0/ 8	0/ 8	4,03 ± 0,57	0/ 8	5,04 ± 0,98
Vancomicina	2/ 13	0/ 11	0/ 11	4,60 ± 0,87	0/ 11	4,92 ± 0,92
Ciprofloxacina	1/ 15	6/ 14 <sup>†</sup>	8/ 14 <sup>†</sup>	2,47 ± 0,96 <sup>†</sup>	6/ 14 <sup>†</sup>	3,61 ± 1,61 <sup>‡</sup>
Vancomicina + Heparina	1/ 10	0/ 9	0/ 9	3,95 ± 0,85	0/ 9	4,85 ± 0,50
Ciprofloxacina + Heparina	1/ 15	0/14	0/ 14	3,72 ± 0,75	0/14	5,05 ± 0,68

Taula 4.3.2.1.1.

<sup>1</sup> Negatiu es va considerar com un número d'ufc < a 15.

<sup>2</sup> Es va considerar un resultat negatiu del cultiu quantitatiu si el número total d'ufc era menor de 40 pel rentat (1,6 log<sub>10</sub> ufc) i 80 pel sonicat (1,9 log<sub>10</sub> ufc) .

<sup>3</sup> Els resultats dels cultius quantitatius estan expressats com la mitjana ± DS del log<sub>10</sub> ufc del segment.

<sup>†</sup> p<0,05 respecte de tots els grups.

<sup>‡</sup> p<0,05 respecte del grup ciprofloxacina amb heparina.

Els animals del grup control van ser sacrificats a les 18 h de la infecció. Cap d'ells va morir abans del sacrifici i tots van presentar un cultiu bacterià positiu dels rentats, dels rodatges i dels sonicats.

L'heparina després de 24 h de tractament no va aconseguir esterilitzar cap catèter. En finalitzar aquest període, cap dels animals havia mort.

En el grup de tractament de la vancomicina no es va negativitzar cap dels rentats, rodatges o sonicats. Dos animals van morir abans de la finalització del període de tractament. Ciprofloxacina sola va ser el tractament que va aconseguir millors resultats en negativitzar 8 dels rentats, 6 dels rodatges i 6 dels sonicats. Un dels animals va morir abans de la finalització del tractament.

El grup de tractament de vancomicina amb heparina tampoc no va aconseguir negativitzar cap dels cultius. Va morir un dels deu animals abans de finalitzar el tractament. El grup de ciprofloxacina amb heparina no va aconseguir negativitzar cap dels cultius i va disminuir, doncs, la taxa d'esterilització del catèter aconseguida amb la ciprofloxacina sola. Un dels 15 animals del grup de tractament es va morir abans de la finalització del període de tractament.

**\* Resultats de la soca *S. aureus* D22-1.**

A la taula 4.3.2.1.2. s'expressen els resultats del tractament de sèpsia per catèter en un model animal produïda per *S. aureus* (soca *S. aureus* D22-1). Els animals van ser sacrificats 24 h després d'iniciar el tractament mitjançant la tècnica de l'antibiòtic-lock. Les concentracions administrades van ser: heparina 2500 UI/mL, vancomicina 2000 µg/mL i ciprofloxacina 1000 µg/mL.

		Rodatge	Rentat		Sonicat	
Grups de tractament	n morts/ n total	n negatius/ n total <sup>1</sup>	n negatius/ n total <sup>2</sup>	Mitjana ± DS <sup>3</sup> (log <sub>10</sub> ufc)	n negatius/ n total <sup>2</sup>	Mitjana ± DS <sup>3</sup> (log <sub>10</sub> ufc)
Control	0/ 9	0/ 9	0/ 9	4,67 ± 1,08	0/ 9	4,86 ± 1,41
Heparina	0/ 7	0/ 7	0/ 7	5,56 ± 1,49	0/ 7	5,69 ± 0,60
Vancomicina	0/ 12	8/ 12 <sup>†</sup>	6/ 12 <sup>†</sup>	2,23 ± 0,70 <sup>†</sup>	5/ 12 <sup>†</sup>	2,94 ± 1,11 <sup>†</sup>
Ciprofloxacina	1/ 13	10/ 12 <sup>†</sup>	7/ 12 <sup>†</sup>	2,34 ± 1,07 <sup>†</sup>	5/ 12 <sup>†</sup>	2,42 ± 0,67 <sup>†</sup>
Vancomicina + Heparina	1/ 11	7/ 10 <sup>†</sup>	3/ 10	2,80 ± 1,41	5/ 10 <sup>†</sup>	3,17 ± 1,71 <sup>‡</sup>
Ciprofloxacina + Heparina	0/ 12	9/12 <sup>†</sup>	8/ 12 <sup>†</sup>	2,29 ± 1,03 <sup>†</sup>	8/12 <sup>†</sup>	1,26 ± 1,24 <sup>†</sup>

Taula 4.3.2.1.2.

<sup>1</sup> Negatiu es va considerar com un número d'ufc < a 15.

<sup>2</sup> Es va considerar un resultat negatiu del cultiu quantitatiu si el número total d'ufc era menor de 40 pel rentat (1,6 log<sub>10</sub> ufc) i 80 pel sonicat (1,9 log<sub>10</sub> ufc).

<sup>3</sup> Els resultats dels cultius quantitatius estan expressats com la mitjana +/- DS del log<sub>10</sub> ufc del segment.

<sup>†</sup> p<0,05 respecte del grup control i d'heparina.

<sup>‡</sup> p<0,05 respecte del grup d'heparina.

Els animals del grup control van ser sacrificats a les 18 h de la infecció. Cap d'ells va morir abans del sacrifici i tots van presentar un cultiu bacterià positiu dels rentats, dels rodatges i dels sonicats.

L'heparina després de 24 h de tractament no va aconseguir esterilitzar cap catèter. En finalitzar aquest període, cap dels animals havia mort.

El grup de tractament de vancomicina va negativitzar vuit de 12 rodatges, sis rentats i cinc sonicats. Cap dels animals va morir abans de la finalització del període de tractament. El grup de tractament de ciprofloxacina va negativitzar 10 dels rodatges, set rentats i cinc sonicats. Un dels 13 animals del grup de tractament va morir.

En el grup de tractament de vancomicina amb heparina, va negativitzar set rodatges i cinc sonicats, però només tres rentats. Un dels animals del grup va morir abans de la finalització del període de tractament. En el grup de tractament de ciprofloxacina amb heparina es van negativitzar nou dels rodatges, vuit dels rentats i vuit dels sonicats. Cap dels animals va morir abans de la finalització del tractament.

#### 4.3.2.2- Eficàcia de vancomicina, ciprofloxacina i rifampicina soles o en combinació.

##### 1. Estudis terapèutics.

##### \* Tractament 24 hores.

A la taula 4.3.2.2.1.1. s'expressen els resultats del tractament de sèpsia per catèter en un model animal produïda per *S. aureus* (soca N16-2). Els animals van ser sacrificats 24 h després d'iniciar el tractament. Les concentracions dels antibiòtics administrats van ser: vancomicina 2000 µg/mL, ciprofloxacina 2000 µg/mL i rifampicina 3000 µg/mL.

		Rodatge	Rentat		Sonicat	
Grups de tractament	n morts/ n total	n negatius/ n total <sup>1</sup>	n negatius/ n total <sup>2</sup>	Mitjana ± DS <sup>3</sup> (log <sub>10</sub> ufc)	n negatius/ n total <sup>2</sup>	Mitjana ± DS <sup>3</sup> (log <sub>10</sub> ufc)
Control	0/13	0 / 13	0/ 13	4,63 ± 1,03	0/ 13	4,57 ± 1,12
Rifampicina	1/ 15	11 / 14 <sup>†</sup>	10/ 14 <sup>†</sup>	1,54 ± 0,82 <sup>†</sup>	10/ 14 <sup>†</sup>	1,63 ± 1,05 <sup>†</sup>
Vancomicina	2/ 13	0/ 11	0/ 11	4,60 ± 0,87	0/ 11	4,92 ± 0,92
Ciprofloxacina	1/ 12	4 / 11	4/ 11	2,83 ± 1,53	4/ 11	2,61 ± 1,77
Vancomicina + Rifampicina	0/ 11	9 / 11 <sup>†</sup>	5/ 11 <sup>†</sup>	1,75 ± 0,76 <sup>†</sup>	5/ 11 <sup>†</sup>	1,64 ± 0,71 <sup>†</sup>
Ciprofloxacina + Rifampicina	1/ 14	13 /13 <sup>†</sup>	7/ 13 <sup>†</sup>	1,54 ± 0,66 <sup>†</sup>	10/ 13 <sup>†</sup>	1,23 ± 0,76 <sup>†</sup>

Taula 4.3.2.2.1.1.

<sup>1</sup> Negatiu es va considerar com un número d'ufc < a 15.

<sup>2</sup> Es va considerar un resultat negatiu del cultiu quantitatiu si el número total d'ufc era menor de 10 pel rentat i pel sonicat (1 log<sub>10</sub> ufc).

<sup>3</sup> Els resultats dels cultius quantitius estan expressats com la mitjana ± DS del log<sub>10</sub> ufc del segment.

<sup>†</sup> p < 0,05 respecte dels grups control i vancomicina.

Els animals del grup control van ser sacrificats a les 18 h de la infecció. Cap d'ells va morir abans del sacrifici i tots van presentar un cultiu bacterià positiu dels rentats, dels rodatges i dels sonicats.

La rifampicina va negativitzar 11 de 14 rodatges i 10 rentats i sonicats. Un dels 15 animals va morir abans de finalitzar el període de tractament.

En el grup de tractament de vancomicina, no es va aconseguir negativitzar cap dels rodatges, rentats i sonicats. Dos dels 13 animals van morir abans de la finalització del període de tractament. La ciprofloxacina va aconseguir negativitzar quatre dels rentats, quatre rodatges i quatre sonicats. Un dels 12 animals va morir abans de la finalització del tractament.

En el grup de tractament de la vancomicina associada a rifampicina, es van negativitzar nou de 11 rodatges, cinc rentats i cinc sonicats. No va morir cap animal abans de la finalització del període de tractament. En el grup de tractament de la ciprofloxacina combinada amb rifampicina, es van negativitzar 13 de 13 rodatges, 10 sonicats i set rentats. Un dels 14 animals va morir abans de la finalització del període de tractament.

\* **Tractament 72 hores.**

A la taula 4.3.2.2.1.2. s'expressen els resultats del tractament de sèpsia per catèter produïda per *S. aureus* (soca N16-2) en un model animal. Els animals van ser sacrificats 72 h després d'iniciar el tractament. Les concentracions dels antibiòtics administrats van ser: vancomicina 2000 µg/mL, ciprofloxacina 2000 µg/mL i rifampicina 3000 µg/mL.

		Rodatge	Rentat		Sonicat	
Grups de tractament	n morts/ n total	n negatiu/ n total <sup>1</sup>	n negatiu/ n total <sup>2</sup>	Mitjana ± DS <sup>3</sup> (log <sub>10</sub> ufc)	n negatiu/ n total <sup>2</sup>	Mitjana ± DS <sup>3</sup> (log <sub>10</sub> ufc)
<b>Control<sup>4</sup></b>	0/20	0 / 20 <sup>†</sup>	0/ 20 <sup>†</sup>	6,2 ± 2,7 <sup>†</sup>	0/ 20 <sup>†</sup>	5,6 ± 1,1 <sup>†</sup>
<b>Rifampicina</b>	0/ 13	11 / 13	13/ 13	1 ± 0,0	12/ 13	1,1 ± 0,4
<b>Vancomicina</b>	7/ 9 <sup>†</sup>	-	-	-	-	-
<b>Ciprofloxacina</b>	2/ 11	4 / 9	8/ 9	1,2 ± 0,5	5/ 9	1,9 ± 1,4
<b>Vancomicina + Rifampicina</b>	1/ 15	12 / 14	13/ 14	1 ± 0,2	10/ 14	1,2 ± 0,4
<b>Ciprofloxacina + Rifampicina</b>	0/ 19	13 /19	15/ 19	1,3 ± 0,4	13/ 19	1,5 ± 0,9

Taula 4.3.2.2.1.2.

<sup>1</sup> Negatiu es va considerar com un número d'ufc < a 15.

<sup>2</sup> Es va considerar un resultat negatiu del cultiu quantitatiu si el número total d'ufc era menor de 10 pel rentat i pel sonicat (1 log<sub>10</sub> ufc).

<sup>3</sup> Els resultats dels cultius quantitatius estan expressats com la mitjana ± DS del log<sub>10</sub> ufc del segment.

<sup>4</sup> El grup control d'infecció va ser processat a les 24 h de produir la infecció.

<sup>†</sup> p < 0,05 respecte de tots els grups.

Els animals del grup control van ser sacrificats a les 18 h de la infecció. Cap d'ells va morir abans del sacrifici i tots van presentar un cultiu bacterià positiu dels rentats, dels rodatges i dels sonicats.

En el grup de tractament de la rifampicina es van negativitzar 13 de 13 rentats, 12 sonicats i 11 rodatges. Cap animal no va morir durant el període de tractament.

En el grup de tractament amb vancomicina sola, set dels nou animals van morir abans de finalitzar el període de tractament.

En el grup de tractament de la ciprofloxacina es van negativitzar quatre de nou rodatges, vuir rentats i cinc sonicats. Dos d'11 animals van morir abans de la finalització del període de tractament.

En el grup de tractament de la vancomicina combinada amb rifampicina es van negativitzar 12 de 14 rodatges, 13 dels rentats i 10 dels sonicats. Un dels 15 animals del grup va morir abans de la finalització del període de tractament.

En el grup de tractament de la ciprofloxacina combinada amb la rifampicina es van negativitzar 13 de 19 rodatges, 15 rentats i 13 sonicats. Cap dels animals del grup no va morir abans de la finalització del període de tractament.

## 2. Avaluació de l'aparició de resistències.

### \* Experiments de 24 hores.

A les taules 4.3.2.2.2.1. i 4.3.2.2.2.2. s'expressen els resultats de l'estudi de l'aparició de resistències en qualsevol dels grups de tractament amb ciprofloxacina o rifampicina soles o en combinació, del rentat o del sonicat dels animals dels grups de tractament de 24 h de la soca *S. aureus* N16-2.

	n resistents/ n total <sup>1</sup>
<b>Ciprofloxacina</b>	0/ 9
<b>Ciprofloxacina + Rifampicina</b>	0/ 6
<b>Total<sup>1</sup></b>	0/ 15

Taula 4.3.2.2.2.1.



	<b>n resistents/ n total<sup>1</sup></b>
<b>Rifampicina</b>	1/ 5
<b>Rifampicina + Vancomicina</b>	0/ 7
<b>Rifampicina + Ciprofloxacina</b>	0/ 6
<b>Total<sup>1</sup></b>	1/ 18

Taula 4.3.2.2.2.2.

<sup>1</sup>Referit al total de soques recuperades, per animal.

### \* Experiments 72 hores.

A les taules 4.3.2.2.2.3. i 4.3.2.2.2.4. s'expressen els resultats de l'estudi de l'aparició de resistències en qualsevol dels grups de tractament amb ciprofloxacina o rifampicina soles o en combinació, del rentat o del sonicat del catèter dels animals del grup de tractament de 72 h de la soca *S. aureus* N16-2.

	<b>n resistents/ n total<sup>1</sup></b>
<b>Ciprofloxacina</b>	0/ 4
<b>Ciprofloxacina + Rifampicina</b>	0/ 8
<b>Total<sup>1</sup></b>	0/ 12

Taula 4.3.2.2.2.3.

	<b>n resistents/ n total<sup>1</sup></b>
<b>Rifampicina</b>	0/ 1
<b>Rifampicina + Vancomicina</b>	0/ 5
<b>Rifampicina + Ciprofloxacina</b>	0/ 8
<b>Total<sup>1</sup></b>	0/ 14

Taula 4.3.2.2.2.4.

<sup>1</sup>Referit al total de soques recuperades, per animal.

Només una de les soques recuperades va presentar una CIM a rifampicina superior a 0,04 µg/mL. I en l'estudi de sensibilitat pel mètode de la macrodilució en brou va ser de 8 µg/mL. Corresponia al grup de tractament de 24 h amb rifampicina.

Això fa una taxa d'aparició de resistències del 20% respecte del total de les soques recuperades del seu grup d'animals i del 5,6% respecte de totes les soques recuperades dels grups de tractament amb rifampicina, ja sigui sola o en combinació durant 24 h.

En els grups de tractament de 72 h, de les 14 soques recuperades del rentat o del sonicat dels grups de tractament amb rifampicina o de les 12 soques recuperades dels grups amb ciprofloxacina, cap va presentar resistència a rifampicina o a ciprofloxacina.

## V- DISCUSIÓ.

La inserció de dispositius intravasculars és un dels procediments que més es realitza als pacients hospitalitzats. Malgrat emprar unes acurades normes de profilaxi, hi ha una elevada taxa d'infeccions i aquestes poden donar lloc a complicacions en el curs clínic dels malalts que fins i tot poden posar en perill la vida dels pacients. La colonització del catèter per microorganismes s'inicia poques hores després de la inserció de les línies vasculars, fonamentalment per la superfície externa del catèter però també per la interna a partir de la connexió. Tradicionalment, el tractament d'aquestes infeccions originades en el catèter havia estat la retirada del mateix i la instauració de cobertura antibiòtica. Però diversos estudis han demostrat que en algunes circumstàncies aquestes infeccions es poden curar sense la necessitat obligatòria de retirar el catèter (2, 7, 10).

Això evita despeses econòmiques al sistema sanitari i incomoditats al malalt derivades de la necessitat d'obtenir nous accessos vasculars en els pacients que requereixen catèters de forma permanent. En l'intent de millorar o trobar noves alternatives de tractament d'aquestes infeccions sense la retirada a priori del catèter, l'objectiu principal d'aquest treball és avaluar l'eficàcia de diferents antibiòtics sols o en combinació per a tractar les infeccions de catèter pel mètode de l'antibiòtic-lock, així com quin valor pot tenir l'heparina local per a aconseguir l'esterilització del catèter. Per a estudiar aquestes combinacions terapèutiques s'ha valorat "in vitro" l'eficàcia antibacteriana de l'heparina per ella mateixa, la dels antibiòtics sols i en combinació, l'estabilitat dels antibiòtics en combinació amb heparina i també amb rifampicina, així com s'ha avaluat "in vivo" l'eficàcia de les diferents pautes estudiades en un nou model animal d'experimentació d'infecció per catèter.

L'activitat antibacteriana de l'heparina i dels diversos antibiòtics va ser avaluada "in vitro" front a bacteris en diverses fases de creixement inclòs en fase de creixement exponencial, que és la manera habitual de determinació de la CIM i la CBM dels antibiòtics. En aquesta situació els bacteris es troben lliures en un medi líquid ric en nutrients i en fase activa de creixement. No obstant, aquesta no és la situació en la que es troben a la clínica, on els

microorganismes causants de sèpsia per catèter estan adherits a una superfície plàstica sense o amb poc accés als nutrients i en una fase estacionària de creixement. És per això que vàrem estudiar el comportament dels diferents antibiòtics en front dels bacteris en les diferents condicions de creixement: fase de creixement exponencial, fase estacionària i fase adherida al cos estrany.

L'heparina es va estudiar en un interval de concentracions de 1000-6000 UI/mL. No va presentar activitat antibacteriana front cap de les 12 soques de *S. aureus* estudiades, ja que tant la CIM<sub>50</sub> com la CIM<sub>90</sub> van ser superiors a 6000 UI/mL. Com les concentracions d'heparina superiors a 5000 UI/mL no es troben per a ús clínic, no es va estudiar l'activitat de l'heparina a concentracions majors a 6000 UI/mL. Donada aquesta manca d'activitat en fase de creixement exponencial, condicions normals en les que es realitza la determinació de la CIM, no es van realitzar noves determinacions de CIM en altres condicions, és a dir, en fase de creixement estacionari o adherent, ni tampoc no es va determinar la CBM d'heparina (taula 4.1.1.1., pàgina 92), ja que la situació metabòlica en la que es troben fa disminuir la sensibilitat als antimicrobians.

Com ja s'ha comentat, els catèters inserits estan predisposats a la formació de beines de fibrina sobre la superfície plàstica la qual cosa afavoreix la colonització per microorganismes, la seva multiplicació protegits dels mecanismes de defensa de l'individu i, finalment, la manifestació clínica d'una infecció (17). Fins ara per a l'estudi de la infecció del catèter s'han desenvolupat diferents models de bacteris en biocapes (177,205,206). Els primers models "in vitro" desenvolupats (207) per a l'estudi de les biocapes consistien en submergir segments de catèter d'un cm en una solució de tampó fosfat o amb aigua destil.lada amb inòculs de microorganisme de l'interval de  $10^7$ - $10^8$  ufc/mL. Aquestes barreges es van incubar durant 96 h a 37°C. Es retiraven els segments de catèter cada 5-10 minuts durant la primera hora i després a diferents temps fins a 96 h (207). Aquests procediments van permetre confirmar i estudiar "in vitro" la colonització bacteriana de superfícies plàstiques amb tècniques de microscopia electrònica.

En el nostre estudi, per a valorar les especials característiques de sensibilitat dels microorganismes que formen biocapes bacterianes es va utilitzar el mètode de determinació de la CIM i la CBM a nivell de la biocapa bacteriana de cadascun dels antibiòtics a partir del model de Ramírez de Arellano i col.laboradors (117,206) amb algunes modificacions: es van utilitzar soques de l'espècie *S. aureus* en lloc de *S. epidermidis*, el segment de catèter va ser de silicona en lloc de PVC, i els rentats del catèter per a garantir que les determinacions de CIMs de la fase adherent es feien només en els bacteris adherits i de les CBMs sense l'efecte de l'antibiòtic, es van fer en MHB en lloc de PBS. La CIM només la vam determinar per macrodilució pel mètode estàndard de la NCCLS.

Aplicant aquesta metodologia als estudis de sensibilitat dels antimicrobians del treball, en el cas de la vancomicina les CIM en fase exponencial i estacionària eren pràcticament iguals i només en una de les 12 soques estudiades "in vitro" es produïa un increment de vuit vegades. Pel que fa a la CBM en fase estacionària respecte de la fase exponencial només en una soca es va incrementar fins a un màxim de setze vegades.

En relació a la CIM en fase adherent respecte de la fase exponencial, aquesta va presentar increments més importants de fins a vuit vegades en tres de les soques estudiades, però en tres de les soques tampoc no es va modificar (taula 4.1.2.1., pàgina 94). Pel que fa a la CBM adherent respecte de l'exponencial, en la majoria de les soques es van produir increments més importants en un interval de 32 fins a més de 512 vegades el valor de la CBM exponencial (taula 4.1.2.2., pàgina 96).

Tot i això, la  $CBM_{90}$  adherent va ser inferior a la concentració de vancomicina a l'interior del catèter de 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  amb què es van tractar les infeccions en el model animal desenvolupat. Si valorem la relació terapèutica per a vancomicina, definida aquesta com el quocient entre la concentració terapèutica administrada, en aquest cas a l'interior del catèter, respecte de la  $CBM_{90}$  adherent, veiem que aquesta és només de 1,95 (2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respecte 1024  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) i això podria explicar la ineficàcia de la vancomicina en el model animal en aquest grup de tractament.

Pel que fa a la ciprofloxacina, la CIM en fase estacionària es va mantenir pràcticament invariada respecte de la CIM determinada en fase exponencial i només en dues soques va incrementar en quatre vegades. Pel que fa a la CIM en fase adherent respecte de la fase de creixement exponencial també es va mantenir pràcticament igual en la majoria de les soques i només en una soca va incrementar en vuit vegades (taula 4.1.2.3., pàgina 98).

Pel que fa a la CBM estacionària de ciprofloxacina respecte de l'adherent només en una soca va incrementar en vuit vegades. En canvi, en relació a la CBM adherent respecte de l'exponencial va incrementar en 16 o més vegades en set de les soques estudiades (taula 4.1.2.4., pàgina 99). Malgrat aquests increments, les concentracions es van mantenir encara fins a un mínim de set i un màxim de 125 vegades per sota de les concentracions de ciprofloxacina a l'interior del catèter usades en el model animal pel tractament de la infecció (respecte del grup de tractament de 2000 µg/mL).

La soca que va presentar el màxim increment de CBM adherent (*S. aureus* D22-1) va mantenir el valor entre 3,9 i 7,8 vegades per sota de la concentració utilitzada en el model animal (1000 o 2000 µg/mL respecte 256 µg/mL) (taula 4.1.2.4., pàgina 99).

Així doncs, si valorem la relació terapèutica per a ciprofloxacina, veiem que aquesta és considerablement superior a la de vancomicina i de l'ordre de 7,8 i 15,6, segons l'experiment (1000 i 2000 µg/mL respecte 128 µg/mL), fet que podria explicar la millor eficàcia terapèutica de la ciprofloxacina respecte de la vancomicina en els grups del model animal.

Veiem doncs com el comportament de la vancomicina i de ciprofloxacina pel que fa als valors de la CIM<sub>50</sub> o CIM<sub>90</sub> és força semblant ja que la majoria de les soques estudiades presenten poques modificacions en relació a la fase de creixement. En canvi, pel que fa als valors de la CBM<sub>90</sub> la disminució de la capacitat bactericida de la vancomicina va ser de fins a 128 vegades per a la CBM<sub>90</sub> de la fase adherent respecte de l'exponencial mentre que per a ciprofloxacina l'increment de la CBM<sub>90</sub> de la fase adherent va ser de 16 vegades respecte de la de fase exponencial, sensiblement inferior a l'increment experimentat per vancomicina.

En relació a la rifampicina les CIMs es van mantenir iguals en la fase de creixement adherent respecte de la fase de creixement exponencial, amb una disminució dels valors en alguna de les soques testades (taula 4.1.2.5., pàgina 101). Pel que fa a la CBM, va incrementar segons la soca en un interval de 32 a 4096 vegades la determinada en fase adherent respecte de l'exponencial. Les soques que van presentar el màxim increment de CBM adherent (soca *S. aureus* A7-4 i F7-42) van mantenir el valor 23 vegades per sota de la concentració utilitzada en el model animal (128 µg/mL respecte 3000 µg/mL) (taula 4.1.2.6., pàgina 103).

En conjunt, la disminució de la sensibilitat a rifampicina va ser lleugerament superior a l'experimentada pels altres dos antibiòtics ja que la  $CBM_{50}$  va presentar increments de més de 130 vegades de la determinada en fase adherent respecte de l'exponencial. Pel que fa a l'increment de la  $CBM_{90}$  de rifampicina, aquesta va incrementar fins a més de 2000 vegades en la fase adherent respecte de l'exponencial.

No obstant això, la relació terapèutica per a rifampicina va ser la més important en relació als tres antibiòtics estudiats i de l'ordre de 23,4 (3000 µg/mL respecte 128 µg/mL), superior a la relació obtinguda en els dos antibiòtics anteriors. I això pot explicar la millor eficàcia terapèutica en els experiments "in vivo" de rifampicina, com més en davant descriurem.

Com hem vist, vancomicina, ciprofloxacina i rifampicina van presentar una disminució de la sensibilitat, però és la rifampicina l'antibiòtic que la presenta en major grau. Aquests resultats demostren que els antibiòtics en front de bacteris adherits a superfícies plàstiques perden la seva capacitat bactericida i els bacteris mostren resistència fenotípica a l'activitat dels mateixos (208). Això explicaria la dificultat de curar infeccions associades a cossos estranys i la necessitat en aquestes situacions de dosis altes d'antibiòtics administrats per períodes més llargs de temps.

Malgrat que tradicionalment s'havia demostrat relació entre el nivell d'antibiòtic efectiu al lloc de la infecció respecte de la CIM determinada

segons els mètodes estàndard de la NCCLS (209), es troba que aquesta relació no es dóna o és baixa quan es tracta d'infeccions del dispositiu intravascular (210), especialment pel que fa als valors de la CBM (206). A més, això es justifica pel fet que la capacitat bactericida dels antibiòtics és depenent fonamentalment de la taxa de creixement, tant per a microorganismes gram positius com per a gram negatius (211), i aquesta disminueix de forma considerable en els bacteris que formen biocapes. Cal tenir en compte el paper de la modificació del microambient a nivell de la biocapa i del metabolisme bacterià dins els mecanismes pels quals els bacteris de les biocapes bacterianes presenten un increment de la resistència a certs antimicrobians (119).

Chuard i col.laboradors, estudiant els bacteris en biocapes han trobat que aquesta disminució de la sensibilitat antibiòtica dels bacteris adherits a la biocapa respecte dels que es mantenen en fase plactònica o de creixement estacionari és major pels aminoglicòsids com gentamicina que per vancomicina o oxacil.lina i menor per a quinolones com leroxacina (212).

Tot i això, encara hi ha dades contradictòries ja que en models de cos estrany subcutani, ciprofloxacina és l'antibiòtic que front *S. epidermidis* més veu modificada la seva CBM en els estudis "in vitro", fins a 200 vegades d'increment, en relació a si els bacteris estan en fase de creixement exponencial o estacionari. En canvi, l'increment que en el mateix experiment presenta "in vitro" la CBM de vancomicina va ser de 12,5 vegades i el de la rifampicina de 2,5 vegades de la fase estacionària respecte de l'exponencial (213).

És per tot això que en el cas de les infeccions del catèter cal buscar la relació entre les concentracions d'antibiòtic al lloc de la infecció i la CIM i la CBM determinades pel mètode de les biocapes, per a poder valorar a la pràctica la sensibilitat dels bacteris en aquestes condicions.

Per a estudiar la sensibilitat "in vitro" de les soques de *S. aureus* als diferents antimicrobians, a més de l'efecte antibacterià que podia tenir cada antibiòtic sol ha calgut estudiar l'efecte que en la cinètica de creixement i de letalitat bacteriana tenien l'heparina o els antibiòtics en combinació. És per això que es van realitzar els estudis de les corbes de letalitat.



Els estudis “in vitro” de l’activitat de l’heparina mitjançant les corbes de letalitat a concentracions de 2500 UI/mL, van confirmar la seva manca d’activitat antibacteriana i que, combinada amb vancomicina o ciprofloxacina, no presentava sinergia o antagonisme. Tot i això, en una de les soques (*S. aureus* ATCC 29213) en la combinació de ciprofloxacina amb heparina es va donar un increment de fins a 1,4 log<sub>10</sub> ufc/mL respecte de la ciprofloxacina sola (apartat 4.1.3.1., pàgina 105).

Si passem a valorar els estudis de l’associació de vancomicina o ciprofloxacina amb rifampicina, veiem que mitjançant les corbes de letalitat, es va demostrar que tampoc no hi ha sinergia o antagonisme en l’associació d’aquests antibiòtics (apartat 4.1.3.2., pàgina 114). Això és important perquè l’esperat benefici terapèutic que podia representar la seva associació no es pot basar en un increment de la capacitat antibacteriana de les combinacions d’antibiòtics front els bacteris en creixement exponencial sinó en altres mecanismes.

Una vegada valorat l’efecte que aquests fàrmacs poden tenir sols o en combinació en el creixement bacterià i demostrada la manca d’efecte de la combinació, calia la confirmació que aquests mantenien l’estabilitat en les mateixes condicions en què els estàvem estudiant en els diferents assajos. Així doncs, en els estudis de la combinació de la vancomicina i ciprofloxacina amb heparina per a la valoració de l’estabilitat de les associacions es va trobar que vancomicina i ciprofloxacina en solucions amb heparina a la concentració de 2500 UI/mL utilitzada a l’estudi es mantenia estable almenys durant 72 h a 37° C en aire ambient (taula 4.2.1., pàgina 126), com ja havia estat trobat per altres autors (214,215).

Els resultats de l’estudi analític a les concentracions fixes usades en el model animal demostren una oscil·lació inferior al 10% en les concentracions d’antibiòtic al llarg de les 72 h d’incubació a 37° C, la qual cosa vol dir que es pot mantenir la solució vancomicina/ heparina o ciprofloxacina/ heparina a

l'interior del catèter sense que es produeixin canvis substancials, almenys durant 3 dies.

Tot i les recomanacions del productor i de d'altres treballs on es demostra que vancomicina pot precipitar quan s'administra simultàniament amb heparina (169,216,217), s'ha trobat que això depèn de les concentracions a les que es barregen aquests dos components, i no s'ha presentat a les concentracions estudiades en aquest i altres treballs (169).

No hem estudiat l'estabilitat de l'heparina sota les mateixes condicions que els antibiòtics. No obstant, Henrickson i col.laboradors (218) si van comprovar la capacitat anticoagulant d'heparina en combinació amb vancomicina i van trobar que no hi havia pèrdua d'activitat anticoagulant, a temperatura ambient i a 4° C en períodes de fins a 6 setmanes.

A més dels estudis d'estabilitat i d'activitat antibacteriana dels antibiòtics sols i de les combinacions a unes concentracions determinades, es van fer també estudis observacionals de precipitació en escales de dilucions seriades inverses de vancomicina o ciprofloxacina amb heparina.

En una escala de dilucions seriades inverses en concentracions de vancomicina des de 4500 µg/mL i de 1000 UI/mL d'heparina a concentracions de 500 µg/mL de vancomicina i 4500 UI/mL d'heparina, les dilucions no van demostrar precipitació macroscòpica. I quan l'escala de dilucions seriades inverses va ser amb ciprofloxacina en concentracions des de 4500 µg/mL i de 1000 UI/mL d'heparina a concentracions de 500 µg/mL de ciprofloxacina i 4500 UI/mL d'heparina, les dilucions tampoc no van demostrar precipitació macroscòpica (Observacions del nostre laboratori. Dades no presentades).

Com hem comentat, els resultats de l'estudi a les concentracions fixes usades en el model animal mostren també una oscil·lació inferior al 10% en les concentracions d'antibiòtic al llarg de les 72 h de l'estudi a 37° C, la qual cosa vol dir que es pot mantenir la solució ciprofloxacina/ heparina a l'interior del catèter sense que es produeixin canvis.

Aquestes valoracions sobre l'estabilitat de l'heparina al llarg del temps tenen implicacions terapèutiques importants a l'hora de tractar els malalts amb

sèpsia per catèter de forma ambulatoria, ja que permeten l'alta hospitalària de pacients sense que s'hagin de fer noves manipulacions del catèter i que estiguin durant dies sota els efectes de tractament antibiòtic efectiu a nivell local de la infecció. A més, el fet que no es produeixi precipitació dels components permet la preservació de la llum del catèter per al seu ús posterior i s'evita el risc d'embolitzacions sistèmiques.

Altres autors també han confirmat l'estabilitat de les combinacions d'antibiòtics amb heparina no només de vancomicina, sinó també de cefazolina, ticarcilina, àcid clavulànic i ciprofloxacina després de la incubació "in vitro" a 25 o 37° C durant intervals de fins a 10 dies. Malgrat tot, això no és extrapolable a tots els antibiòtics ja que, a part de la inactivació en el temps que aquests compostos presenten, l'estabilitat de les combinacions amb heparina d'alguns betalactàmics com ceftazidima, ha demostrat ser més curta (214).

Per altra banda, els estudis d'estabilitat de la combinació de vancomicina o ciprofloxacina amb rifampicina a les mateixes concentracions que les aplicades al catèter van demostrar l'estabilitat dels antibiòtics amb una oscil·lació de les concentracions a les 72 h inferior al 10% per a vancomicina i ciprofloxacina soles, però en el cas de les associacions la pèrdua d'activitat va ser major per a rifampicina amb ciprofloxacina que per a rifampicina amb vancomicina, que va ser de l'ordre del 15% i del 25%, respectivament. Cal tenir en compte, però, que aquesta disminució de l'estabilitat també es dona a la rifampicina sense combinar i és de l'ordre del 25% (taula 4.2.2., pàgina 127).

Malgrat aquesta discreta disminució de la concentració d'antibiòtic a les 72 h, els valors encara són prou alts com per a poder tractar de forma satisfactòria la infecció ja que la relació terapèutica definida anteriorment es manté elevada hores, especialment pel que fa als valors de la ciprofloxacina i la rifampicina.

Pel que fa al model animal, malgrat que l'heparina per ella mateixa "in vitro" no tenia cap efecte antibacterià, en combinació amb els antibiòtics podia facilitar la penetració dels mateixos a través de la beina de fibrina i millorar així la seva eficàcia. Aquesta hipòtesi necessitava la valoració en un model "in vivo". Per això es va desenvolupar aquest model animal d'infecció per catèter produïda per *S. aureus* que pretén l'estudi de la mateixa, així com la valoració de l'eficàcia terapèutica de vancomicina, ciprofloxacina o rifampicina soles i de les combinacions i la de la taxa d'aparició de resistències a ciprofloxacina i/o a rifampicina.

El model animal desenvolupat el podem classificar per les seves característiques dins els models animals discriminatius i compleix les principals característiques del model animal ideal abans esmentades (182,183,190). Les característiques fonamentals d'aquest model animal són que la infecció va ser provocada per via endoluminal després de la inserció del catèter, que té un trajecte subcutani abans de l'externalització, i que l'animal no tenia alteracions del sistema immunitari o en els mecanismes de formació de fibrina i els inòculs bacterians en el moment d'iniciar el tractament eren de l'ordre de  $10^7$ - $10^8$  ufc/mL. Aquesta fisiopatologia és comparable a la situació més freqüent en humans que tenen cateteritzacions durant llargs períodes de temps en els que la infecció es produeix per via endoluminal (17,219,220). Aquest model animal és fàcil d'establir, és reproduïble i demostra recomptes bacterians similars als obtinguts en puntes de catèter de pacients amb bacterièmia per catèter (120). Pels experiments d'estandardització del model animal es va escollir la soca *S. aureus* N16-2, una de les obtingudes del catèter d'un malalt afecte de sèpsia per catèter i pels experiments es van usar les soques de *S. aureus* N16-2 i D22-1, que varen ser dues de les soques que van presentar un comportament més homogeni en els experiments d'estandardització.

Es va utilitzar pel model una soca de *S. aureus* ja que clínicament aquesta espècie d'estafilococ dóna més problemes de tractament i experimentalment permet una més fàcil identificació del microorganisme com a patogen.

Per a l'estandardització del model animal es va trobar que la infecció del catèter estava ben establerta després de 18 h de la injecció de l'inòcul bacterià en fase de creixement exponencial. Retardar a 48 h el sacrifici de l'animal després de la infecció, no estava associat amb un increment dels recomptes bacterians al catèter, que es van mantenir en un interval de  $10^4$ - $10^5$  ufc/mL, però, en canvi, 2 dels 10 animals del grup de l'estandardització van morir a causa de la sèpsia per *S. aureus* abans del sacrifici. Això va implicar que es decidís iniciar el tractament de la infecció a les 18 h d'introduir l'inòcul bacterià a l'interior del catèter (taula 4.3.1., pàgina 128).

Cal tenir en compte, però, que amb aquest model no es va valorar el fet que aquestes infeccions, especialment quan estan produïdes per *S. aureus* o *E. faecalis*, tenen gran facilitat de produir complicacions metastàsiques i només es va valorar el tractament i l'evolució del catèter com a font d'infecció, a diferència de d'altres models animals que inclouen l'estudi de les repercussions sistèmiques de la infecció (221).

Els estudis de tractament de la infecció de catèter en el model animal realitzats amb vancomicina, ciprofloxacina i heparina soles o en combinació es van fer amb les soques *S. aureus* N16-2 i D22-1 en els experiments de 24 h de durada. L'heparina sola a la concentració usada no va tenir cap efecte en la disminució dels recomptes bacterians ja sigui del rentat, el sonicat o el rodatge respecte dels valors obtinguts en el grup control. Aquests resultats confirmen doncs els valors trobats en els experiments "in vitro".

Vancomicina va ser menys efectiva que ciprofloxacina per a esterilitzar el catèter. En general, els glicopèptids són menys actius que els betalactàmics i altres antibiòtics actius per a tractar les infeccions produïdes per *S. aureus*. A més, en el nostre estudi "in vitro", vancomicina va presentar increments de CBMs superiors amb un interval de 32 a 512 vegades quan es va testar en front de bacteris adherits a catèter respecte dels valors obtinguts en fase de creixement exponencial, fet que coincideix amb les dades que trobem a la bibliografia (117). En aquests experiments de 24 h de durada, vancomicina sola no va esterilitzar cap superfície externa dels 11 animals de la soca N16-2 i només 8 dels 12 animals de la soca D22-1.

Ciprofloxacina va ser més activa que vancomicina per a esterilitzar el catèter i disminuir l'inòcul bacterià en els experiments "in vivo" de 24 h de durada. Ciprofloxacina va esterilitzar també la superfície externa de 10 dels 12 catèters infectats amb la soca D22-1, també obtinguda d'un malalt afecte de sèpsia per catèter, i de 6 dels 14 infectats amb la soca N16-2. L'interès d'aquest resultat està en el fet que els animals no van ser tractats amb antibiòtics per via sistèmica. Potser la presència d'antibiòtic a l'interior del catèter evita la migració dels microorganismes cap a la superfície externa, facilitant així l'acció dels mecanismes de defensa front els microorganismes; o potser és la difusió passiva de l'antibiòtic a través de la paret del catèter la que neteja de microorganismes viables la superfície externa del mateix (taula 4.3.2.1.1. i 4.3.2.1.2., pàgines 129 i 131, respectivament).

En qualsevol cas, això són hipòtesis que aquest estudi no pot clarificar. Si es pot afirmar que l'absència de creixement bacterià a la superfície externa del catèter no va ser deguda a la presència d'antibiòtic en el moment del processat del cultiu ja que es va fer el rentat del catèter abans del cultiu semiquantitatiu per evitar el vertit de l'antibiòtic intraluminal a la superfície de la placa de cultiu amb els procediments del rodatge. Com ja hem comentat, en tercer lloc es realitzaven els procediments pel sonicat del catèter.

Un altre dels procediments realitzats per a evitar l'efecte de l'antibiòtic ha estat el doble centrifugat del rentat i del sonicat i el recanvi del sobrenedant amb antibiòtic per MHB estèril. Cal remarcar, però, que en els experiments del model animal realitzats amb heparina (apartat 4.3.2.1., pàgina 129) es va resuspendre el sediment del rentat amb dos mL i el del sonicat amb quatre mL, mentre que en els experiments del model amb rifampicina (apartat 4.3.2.2., pàgina 133) el sediment es resuspensia amb 1 mL. Aquest fet condiciona que els punts de tall considerats pels experiments canviï i té implicacions en la valoració dels resultats dels grups de tractament.

Pel que fa als grups de tractament de combinacions amb heparina, es pot dir que l'heparina no té activitat antibacteriana ni "in vitro" ni "in vivo" en infeccions per catèter produïdes per *S. aureus*. L'heparina no va aportar cap

milloria terapèutica als antibiòtics administrats localment amb la tècnica de l'antibiòtic-lock per al tractament de les infeccions de catèter per *S. aureus*. Sembla, doncs, que l'heparina-lock ha de ser usada quan el risc de trombosi del catèter sigui alt però que la seva utilització no pot estar basada en la suposada utilitat antibacteriana o bé afavoridora de l'activitat antibacteriana, almenys dels antibiòtics en estudi. Alguns treballs han trobat que en el cas d'infecció i trombosi del catèter, es poden utilitzar fibrinolítics per millorar l'eficàcia terapèutica dels antibiòtics (70,222), encara que estudis aleatoritzats troben aquesta pràctica perillosa perquè s'afavoreix la disseminació de la infecció (161).

Als inicis d'aquest treball amb el model animal es va veure que vancomicina era ineficaç per esterilitzar catèters amb la tècnica de l'antibiòtic-lock aplicada durant 24 h i només va ser parcialment activa ciprofloxacina. Aquests dos han estat els antibiòtics més usats a la clínica pel tractament de la infecció del catèter mantenint el catèter, per la seva activitat "in vitro" front els estafilococs, la seva estabilitat en solució en comparació als betalactàmics i, quan és necessària la seva administració per via sistèmica, la seva favorable farmacocinètica que permet una dosificació de dues vegades al dia. A més, en el cas de ciprofloxacina, ens permet també l'administració per via oral. Per això, i tenint en compte els resultats inicials en el model animal, es van estudiar altres estratègies de tractament antibiòtic.

Pel que fa a l'activitat de rifampicina sola o en combinació, diferents estudis "in vitro" i "in vivo" en infeccions de material protèsic han demostrat la gran activitat de rifampicina front *S. aureus* per la qual cosa s'ha postulat la utilització d'aquest antibiòtic en les infeccions que es produeixen sobre cos estrany (213). Malgrat això, la utilització aïllada de rifampicina a la clínica ha estat qüestionada per la selecció de soques mutants resistents a la mateixa que s'han acompanyat d'un fracàs terapèutic. Aquesta dada ha estat confirmada per l'aparició de mutants resistents en els estudis "in vitro" (223), en models animals (224) i en els estudis clínics on es documenten els fracassos terapèutics (225,226).

Partint d'aquesta consideració s'ha valorat la utilitat de la rifampicina sola en el tractament local de la infecció de catèter, s'ha considerat la taxa d'aparició de soques resistents i si l'associació amb vancomicina o ciprofloxacina ha incrementat l'eficàcia terapèutica d'aquestes així com si ha suposat una disminució de la taxa d'aparició de resistències.

Els resultats dels estudis terapèutics "in vivo" demostren la superior eficàcia de rifampicina sola comparativament a ciprofloxacina i vancomicina soles en l'esterilització dels catèters. En el nostre estudi rifampicina va negativitzar el cultiu semiquantitatiu de 11 de 14 catèters i de 10 de 14 cultius quantitatius quan el tractament va ser de 24 h. Pel que fa a la vancomicina sola en el mateix experiment no va aconseguir negativitzar cap cultiu semiquantitatiu o quantitatiu, mentre que ciprofloxacina va negativitzar quatre dels catèters, ja siguin semiquantitatius o quantitatius (taula 4.3.2.2.1.1., pàgina 133).

En relació a l'associació de vancomicina amb rifampicina, aquesta va millorar els efectes de la vancomicina sola en el grup de 24 h, fet que ja ha estat trobat en altres experiments "in vitro" de la combinació de vancomicina amb rifampicina en bacteris formant biocapes (179).

Quan el tractament va ser de 72 h rifampicina va negativitzar 11 de 13 cultius semiquantitatius, 12 de 13 sonicats i 13 de 13 rentats de catèter (taula 4.3.2.2.1.2., pàgina 135). En el mateix experiment de 72 h, vancomicina va ser no valorable per l'elevada mortalitat dels animals abans d'acabar el temps de tractament i, ciprofloxacina va ser parcialment eficaç, ja que va disminuir els recomptes bacterians respecte del grup control i va negativitzar només quatre de nou rodatges i cinc de nou sonicats, però vuit de nou rentats.

Finalment, el grup d'associació de vancomicina amb rifampicina va presentar uns resultats paral·lels als de la rifampicina sola i clarament superiors al grup de la vancomicina sola, ja que només 1 dels 15 animals va morir abans d'acabar el període de tractament de l'estudi i va aconseguir negativitzar 10 de 14 sonicats, 12 de 14 rodatges i 13 de 14 rentats. Pel que fa a l'associació de ciprofloxacina amb rifampicina va negativitzar 13 de 19 rodatges o sonicats i 15 de 19 rentats.



Podem dir, doncs, que l'associació de ciprofloxacina amb rifampicina va tenir una eficàcia comparable a la que va presentar la rifampicina aïlladament, tant en el grup de tractament de 24 h com en el de 72 h.

En conjunt, hem vist com rifampicina sola o en combinació amb vancomicina o ciprofloxacina és molt eficaç esterilitzant catèters infectats per *S. aureus* mitjançant el tractament amb la tècnica de l'antibiòtic-lock. El fet que la relació terapèutica de la rifampicina sigui clarament superior a la de vancomicina o ciprofloxacina (valors de 23,4 respecte de 7,8 per ciprofloxacina 2000 µg/mL o de 1,95 per vancomicina 2000 µg/mL) pot explicar que la seva eficàcia en aquest model animal sigui més elevada a la de vancomicina o ciprofloxacina soles.

Alguns estudis fets en models "in vitro" troben, però, que hi ha altres associacions d'antibiòtics com la de minociclina amb rifampicina que és més efectiva en l'esterilització del catèter que no l'associació de vancomicina i rifampicina (227).

Altres estudis troben que rifampicina sola és l'antibiòtic que dóna millors resultats ja que aconsegueix esterilitzar la majoria dels implants a les 48 h d'iniciat el tractament en un model animal de cos estrany subcutani (213). Amb inòculs baixos, rifampicina eradica *S. aureus* en el model "in vivo" mentre que en els estudis "in vitro" només ho aconsegueix amb inòculs baixos i no amb inòculs alts, ja que amb els alts es dóna aparició de resistències (210). Això pot estar explicat per l'ajuda dels mecanismes de defensa de l'hoste en el procés de resolució de la infecció. En el nostre estudi la concentració elevada de l'inòcul és possiblement el factor que ha afavorit el desenvolupament de resistències.

En conjunt, podem veure com deixar el tractament "in situ" durant 72 h, una vegada demostrada l'estabilitat dels fàrmacs durant aquest període de temps, millora els resultats de la ciprofloxacina sola, lleugerament també millora els de la rifampicina i de l'associació vancomicina amb rifampicina tot i que es produeix un petit empitjorament de ciprofloxacina amb rifampicina respecte del grup de tractament de 24 h.

En relació, doncs, a l'eficàcia del tractament amb ciprofloxacina, com en altres treballs es demostra efectiu en el tractament de les infeccions ben establertes produïdes per *S. aureus* (228).

En el nostre estudi, pel que fa als estudis de l'aparició de resistències, de les 18 soques recuperades (ja sigui del rentat i/o del sonicat) en acabar el tractament corresponents a grups terapèutics amb rifampicina, ja sigui sola o en combinació, només un aïllament va créixer quan es va cultivar en plaques amb 0,04 µg/mL de rifampicina. Aquesta soca analitzada posteriorment va presentar una CIM de 8 µg/mL i corresponia al grup d'animals tractat només amb rifampicina per un període curt (grup de 24 h) (taula 4.3.2.2.2.2., pàgina 137). Això suposa una taxa d'aparició de resistències del 5,6%, sobre el total de soques recuperades en aquests cultius. Sobre el total de 5 soques recuperades en el grup de rifampicina de curta durada suposa un 20 % de les soques. Aquest fenomen no es va observar quan el tractament va ser combinat amb els altres dos antibiòtics durant 24 h o bé quan va ser de 72 h. És possible que l'elevada concentració de rifampicina a l'interior del catèter administrada en els nostres estudis en aquest model animal (3000 µg/mL, 375 vegades superior a la CIM de la soca resistent) aconseguís, confirmada l'estabilitat de l'antibiòtic durant almenys 72 h, evitar l'aparició de soques resistents quan el tractament es perllonga fins a 72 h.

Tot i que no en tots els casos, diversos autors han descrit la ràpida aparició de resistències a rifampicina en *S. epidermidis* quan es dona com a tractament únic (119,229,230,231). Es justifiquen les diferències en la taxa d'aparició de resistències entre autors en la concentració de l'inòcul utilitzat, ja que models de cos estrany troben una menor taxa de resistències quan menor és la concentració de l'inòcul en el moment d'iniciar el tractament (213,230). L'aparició de resistències a rifampicina en el tractament associat a altres antibiòtics no es confirma en tots els estudis (232). Tot i això es recomana que pel tractament d'aquestes infeccions en humans sempre s'administri la rifampicina en associació. És per aquest motiu que s'han assajat diverses combinacions antibiòtiques que inclouen glicopèptids i quinolones. Totes les combinacions han demostrat activitat antibacteriana amb disminucions de l'inòcul inicial que van del 79% al 100%. Les combinacions de vancomicina i ciprofloxacina amb rifampicina van ser estadísticament significatives en la disminució de l'inòcul respecte de la

combinació de vancomicina amb netilmicina o netilmicina amb daptomicina (210).

A més, en el nostre treball, al contrari del que hem comentat en el cas de la rifampicina, no es va poder documentar ningun cas d'adquisició de resistències a ciprofloxacina a ninguna de les 27 soques recuperades en els grups de tractament amb ciprofloxacina sola o combinada després dels experiments "in vivo".

Finalment, donada la continua necessitat de cateteritzar pacients ja sigui amb finalitats diagnòstiques o terapèutiques, la incidència d'infeccions per catèter continua sent elevada. Creiem que això obliga a una continua revisió de les pautes diagnòstiques i terapèutiques que permetin millorar el maneig d'aquestes infeccions i del malalt cateteritzat, tot i que cal tenir en compte que el tractament de les sèpsies per catèter ha de ser fet de forma individualitzada donat l'elevat nombre de factors que la influencien (13,144,233).

És per aquests resultats obtinguts dels estudis en models animals que recomanem que es realitzin estudis controlats aleatoritzats i prospectius en humans per a validar en la clínica l'eficàcia del tractament antibiòtic amb rifampicina sola o combinada a altes dosis mitjançant la tècnica de l'antibiòtic-lock de les infeccions de catèter produïdes per *S.aureus*.

Aquest treball aporta unes dades que podran millorar el tractament dels malalts afectes d'aquestes infeccions si els assajos clínics no contradiuen aquestes troballes.

## VI- CONCLUSIONS.

**Aquest treball d'investigació sobre el tractament de la infecció del catèter per *S. aureus*, ens permet extreure les següents conclusions:**

### **Estudis "in vitro":**

- 1- L'heparina a concentracions iguals o menors a 6000 UI/mL no té activitat antibacteriana front les soques de *S. aureus* estudiades causants d'infecció de catèter.
- 2- Vancomicina, ciprofloxacina i rifampicina quan s'avaluen davant de bacteris formant biocapes presenten un augment molt considerable de la seva concentració bactericida mínima.
- 3- En els estudis de sinergia la combinació de vancomicina o ciprofloxacina amb heparina no representa cap potenciació de l'efecte antibacterià.
- 4- En els estudis de sinergia, la combinació de vancomicina o ciprofloxacina amb rifampicina no demostra major activitat que rifampicina sola.
- 5- Vancomicina i ciprofloxacina romanen estables almenys 72 h quan es combinen amb heparina o rifampicina a les concentracions estudiades.

### **Estudis "in vivo":**

- 1- Aquest treball ha permès estandarditzar un nou model animal d'infecció de catèter per *S. aureus*. És un model senzill i reproducible en el que la infecció es produeix per via endoluminal en un animal sa. Aquest model permet el tractament local de la infecció de catèter mitjançant la tècnica de l'antibiòtic-lock.
- 2- Els experiments terapèutics han permès concloure que l'heparina per si mateixa no té cap valor en el tractament local de la infecció de catèter, ni sola ni combinada amb els antibiòtics de l'estudi.
- 3- Dels antibiòtics estudiats, el més eficaç ha estat la rifampicina i el menys la vancomicina.

4- És possible esterilitzar la superfície externa d'un catèter infectat mitjançant l'administració únicament endoluminal d'antibiòtics.

5- El tractament de la infecció de catèter per *S. aureus* mitjançant l'administració de rifampicina durant 24 h facilita l'aparició de soques resistents. Això no succeeix si el tractament es perllonga per espai de 72 h o es combina rifampicina amb vancomicina o ciprofloxacina.

**Tenint en compte aquest resultat, creiem que existeix l'evidència experimental suficient com per endegar assajos clínics aleatoritzats i controlats que confirmen el paper de la tècnica de l'antibiotic-lock en el tractament de la infecció de catèter en general, i per *S. aureus* en concret.**

## VII- BIBLIOGRAFIA.

1. Stamm WE. Infections related to medical devices. *Ann Intern Med* 1978; 89:764-9.
2. Raad I. Intravascular-catheter-related infections. *Lancet* 1998;351:893-8.
3. Greene JN. Catheter-related complications of cancer therapy. *Infect Dis Clin North Am* 1996;10:255-95.
4. Vallès J, León C, Álvarez-Lerma F, for the Spanish collaborative group for infections in Intensive Care Units of Sociedad Española de Medicina Intensiva y Unidades Coronarias (SEMIUC). Nosocomial bacteremia in critically ill patients: a multicenter study evaluating epidemiology and prognosis. *Clin Infect Dis* 1997;24:387-95.
5. Liñares J, Pulido MA, Bouza E. Infección asociada a catéteres. *Medicine (Madr)* 1995;6:3395-404.
6. Nystrom B, Larsen SO, Dankert J, Daschner F, Greco D, Gronroos P et al. Bacteraemia in surgical patients with intravenous devices: a European multicentre incidence study. The European Working Party on Control of Hospital Infections. *J Hosp Infect* 1983;4:338-49.
7. Jeejeebhoy KN. Total parenteral nutrition in the hospital and at home. Boca Raton, FL: CRC Press,1983;110-3.
8. Garden OJ, Sim AJW. A comparison of tunneled and non tunneled subclavian vein catheters: a prospective study of complications during parenteral feeding. *Clin Nutr* 1983:51-4.
9. Capdevila JA. Catheter-related infection: an update on diagnosis, treatment and prevention. *Int J Infect Dis* 1998;2:230-6.

10. Benoit JL, Carandang G, Sitrin M, Arnow PM. Intraluminal antibiotic treatment of central venous catheter infections in patients receiving parenteral nutrition at home. *Clin Infect Dis* 1995;21:1286-8.
11. Andris DA, Krzywda EA, Edmiston CHE, Krepel CJ, Gohr CM. Elimination of intraluminal colonization by antibiotic lock in silicone vascular catheters. *Nutrition* 1998;14:427-32.
12. Groeger JS, Lucas AB, Thaler HT, Friedlander-Klar H, Brown AE, Kiehn TE et al. Infectious morbidity associated with long-term use of venous devices in patients with cancer. *Ann Intern Med* 1993;119:1168-74.
13. Messing B, Peitra-Cohen S, Debure A, Beliah M, Bernier JJ. Antibiotic-lock technique: a new approach to optimal therapy for catheter-related sepsis in home-parenteral nutrition patients. *JPEN* 1988;12:185-9.
14. León M, García M, Herranz MÁ, González V, Martínez A, Castillo F et al. Rentabilidad diagnóstica de la tinción de gram de piel pericatéter y conexión en la predicción de bacteriemia relacionada con catéter intravascular. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1998;16:214-8.
15. Capdevila JA. Diagnóstico y tratamiento de la sepsis por catéter. *Med Clin (Barc)*1991;97:506-10.
16. Cercenado E, Ena J, Rodríguez-Creixems M, Romero I, Bouza E. A conservative procedure for the diagnosis of catheter-related infections. *Arch Intern Med* 1990;150:1417-20.
17. Maki DG. Infections caused by intravascular devices used for infusion therapy: pathogenesis, prevention and management. A: Bisno AL and Waldvogel FA editors, *Infections associated with indwelling Medical Devices*. Washington DC: American Society for Microbiology, 1994;155-212.

18. Pittet D, Tarara D, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infection in critically ill patients. Excess length of stay, extra costs, and attributable mortality. *JAMA* 1994;271:1598-601.

19. Estudio de prevalencia de las infecciones nosocomiales en los hospitales españoles. Proyecto EPINE. Estudio año 1994. Madrid: Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene, 1995.

20. Power J, Wing EJ, Talamo TS, Stanko R. Fatal bacterial endocarditis as a complication of permanent indwelling catheters. *Am J Med* 1986;81:166-8.

21. Arnow PM, Quimosing EM, Beach M. Consequences of intravascular catheter sepsis. *Clin Infect Dis* 1993;16:778-84.

22. Spengler RF, Greenough WB III. Hospital costs and mortality attributed to nosocomial bacteremias. *JAMA* 1978;240:2455-8.

23. Schwartz C, Henrickson KJ, Roghmann K, Powell K. Prevention of bacteremia attributed to luminal colonization of tunneled central venous catheters with vancomycin-susceptible organisms. *J Clin Oncol* 1990;8:1591-7.

24. Rello J, Ochagavía A, Sabanes E, Roque M, Mariscal D, Reynaga E et al. Evaluation of outcome of intravenous catheter-related infections in critically ill patients. *Am J Resp Crit Care Med* 2000;162:1027-30.

25. Morís de la Tassa J, Fernández Muñoz P, Antuña Egocheaga A, Gutiérrez del Río MC, de la Fuente García B, Cartón Sánchez JA. Estudio de los costes asociados a la bacteriemia relacionada con el catéter. *Rev Clín Esp* 1998;198:641-6.

26. Smego RA Jr, Gainer RB. Home intravenous antimicrobial therapy provided by a community hospital and a university hospital. *Am J Hosp Pharm* 1985;42:2185-9.



27. Messing B. Catheter-sepsis during home parenteral nutrition: use of the antibiotic-lock technique. *Nutrition* 1998;14:466-7.
28. The College of American Pathologist. The College of American Pathologist Workload Recording Methods and Personnel Management Manual (CAP WLR). Northfield III:College of American Pathologists,1992.
29. Siegman-Igra Y, Anglim AM, Shapiro DE, Adal KA, Strain BA, Farr BM. Diagnosis of vascular catheter-related bloodstream infection: a meta-analysis. *J Clin Microbiol* 1997;35:928-36.
30. Pearson ML. Hospital Infections Program. Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for Prevention of intravascular device-related infections. 1995. <http://www.cdc.gov/ncidod/hip/iv/iv.htm>. (17/11/99).
31. Raad II, Hohn DC, Gilbreath BJ, Suleiman N, Hill LA, Brusco PA et al. Prevention of central venous catheter-related infections by using maximal sterile barrier precautions during insertion. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1994;15:231-8.
32. Raad I, Darouiche R, Dupuis J, Abi-Said D, Gabrielli A, Hachem R et al. Central venous catheter coated with minocycline and rifampin for the prevention of catheter-related colonization and bloodstream infections. A randomized, double-blind trial. *Ann Intern Med* 1997;127:267-74.
33. Segura M, Alvarez-Lerma F, Tellado JM, Jimenez-Ferrerres J, Oms L, Baro T et al. A clinical trial on the prevention of catheter-related sepsis using a new hub model. *Ann Surg* 1996;223:363-9.
34. Maki DG, Stolz SM, Wheeler S, Mermel LA. Prevention of central venous catheter-related bloodstream infection by use of an antiseptic-impregnated catheter. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 1997;127:257-66.

35. Veenstra DL, Saint S, Saha S, Lumley T, Sullivan SD. Efficacy of antiseptic-impregnated central venous catheters in preventing catheter-related bloodstream infection. *JAMA* 1999;281:261-7.
36. Ryan JA Jr, Abel RM, Abbott WM, Hopkins CC, Chesney T, Colley R et al. Catheter complications in total parenteral nutrition. A prospective study of 200 consecutive patients. *N Engl J Med* 1974;290:757-60.
37. Trilla A, Gatell JM, Mensa J, Latorre X, Almela M, Soriano E et al. Risk factors for nosocomial bacteremia in a large spanish teaching hospital: a case-control study. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1991;12:150-6.
38. Brown RB, Cipriani D, Schulte M, Corl A, Pieczarka R. Community-acquired bacteremias from tunneled central intravenous lines: results from studies of a single vendor. *Am J Infect Control* 1994;22:149-51.
39. Raviglione MC, Battan R, Pablos-Mendez A, Acebes-Casillas P, Mullen MP, Taranta A. Infections associated with Hickman catheters in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med* 1989;86:780-6.
40. Michel L, Mc Michan JC, Bachy JL. Microbial colonization of indwelling central venous catheters: Statistical evaluation of potential contaminating factors. *Am J Surg* 1979;137:745-8.
41. Maki DG. Infections associated with intravascular lines. A: Remington JS, Swartz MN, editors. *Current clinical topics in infectious diseases*. New York:McGraw Hill Book Company,1982:309-63.
42. Nahata MC, King DR, Powell DA, Marx SM, Ginn-Pease ME. Management of catheter-related infections in pediatric patients. *JPEN* 1988;12:58-61.
43. Merrell SW, Peatross BG, Grossman MD, Sullivan JJ, Harker WG. Peripherally inserted central venous catheters. Low-risk alternatives for ongoing venous access. *West J Med* 1994;160:25-30.

44. Pinilla JC, Dixie F, Ross F, Martin T, Crump H. Study of the incidence of intravascular catheter infection and associated septicaemia in critically ill patients. *Crit Care Med* 1983;11:21-5.
45. Warriar I, Baird-Cox K, Lusher JM. Use of central venous catheters in children with haemophilia: one haemophilia treatment centre experience. *Haemophilia* 1997;3:194-8.
46. Mirro J Jr, Rao BN, Kumar M, Rafferty M, Hancock M, Austin BA et al. A comparison of placement techniques and complications of externalized catheters and implantable port use in children with cancer. *J Pediatr Surg* 1990;25:120-4.
47. Coll P, Iglesias M, Rello J, Solé R, Alonso C, Prats G. Valor del estudio de la superficie extraluminal e intraluminal en la detección de la colonización de los catéteres. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1991;9:39-42.
48. Pemberton LB, Lyman B, Lander V, Covinsky J. Sepsis from triple versus single-lumen catheters during total parenteral nutrition in surgical or critically ill patients. *Arch Surg* 1986;121:591-4.
49. Yeung C, May J, Hughes R. Infection rate for single lumen versus triple lumen subclavian catheters. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1988;9:154-8.
50. Hilton E, Haslett TM, Borenstein MT, Tucci V, Isemberg HD, Singer C. Central catheter infections: single versus triple-lumen catheters. Influence of guide wires on infection rates when used for replacement of catheters. *Am J Med* 1988;84:667-72.
51. Richert H, Hubert B, Nitemberg G, Andremont A, Buu-Hoy A, Ourbak P et al. Prospective multicenter study of vascular catheter-related complications and risk factors for positive central-catheter cultures in intensive care unit patients. *J Clin Microbiol* 1990;28:2520-5.

52. Circeo L, McGee W, Brown RB. Management of infections in adult intensive care unit patients: Part II. *Infect Dis Clin Pract* 1995;3:254.
53. Darbyshire PJ, Weightman NC, Speller DC. Problems associated with indwelling central venous catheters. *Arch Dis Child* 1985;60:129-34.
54. León A, Díaz R, Ibáñez J, Nolla M. Factores de riesgo de infección por catéter. A: León Gil C, coordinador. Sociedad Española de Medicina Intensiva y Unidades Coronarias. Grupo de Trabajo de Enfermedades Infecciosas. Conferencia de Consenso "Infección por catéter en UCI". Madrid: Editorial Fernández, 1996;45-56.
55. Goetz AM, Muder RR, Wagener MM. Risk of infection due to femoral placement of central venous catheters. A: program and abstracts of the 35<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (San Francisco, California). Washington DC: American Society for Microbiology, 1995, abstract J6.
56. Rello J. Prevención de las infecciones por catéter: ¿ha llegado la hora del cambio?. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1998;16:53-4.
57. Raad I, Davis S, Khan A, Tarrand J, Elting L, Bodey GP. Impact of central venous catheter removal on the recurrence of catheter-related coagulase-negative staphylococcal bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1992; 13:215-21.
58. Kowalewska-Grochowska K, Richards R, Moysa GL, Lam K, Costerton JW, King EG. Guidewire catheter change in central venous catheter biofilm formation in a burn population. *Chest* 1991;100:1090-5.
59. Cook D, Randolph A, Kerneman P, Cupido C, King D, Soukup C et al. Central venous catheter replacement strategies: A systematic review of the literature. *Crit Care Med* 1997;25:1417-24.

- 
60. Bozzetti F, Terno G, Bonfanti G, Scarpa D, Scotti A, Ammatuna M et al. Prevention and treatment of central venous catheter sepsis by exchange via a guidewire. *Ann Surg* 1983;198:48-52.
61. Pettigrew RA, Lang SDR, Haydock DA, Parry BR, Bremmer DA, Hill GL. Catheter-related sepsis in patients on intravenous nutrition: a prospective study of quantitative catheter cultures and guidewire changes for suspected sepsis. *Br J Surg* 1985;72:52-5.
62. Sitges-Serra A, Liñares J, Garau J. Catheter sepsis: the clue is the hub. *Surgery* 1985;97:355-7.
63. Ena J, Cercenado E., Martínez D., Bouza E. Cross-sectional epidemiology of phlebitis and catheter-related infections. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1992;13:15-20.
64. Domínguez MA, Liñares J, Pulido A, Pérez JL, de Lencastre H. Molecular tracking of coagulase-negative staphylococcal isolates from catheter-related infections. *Microb Drug Resist* 1996;2:423-9.
65. Press OW, Ramsey PG, Larson EB, Fefer A, Hickman RO. Hickman catheter infections in patients with malignancies. *Medicine (Baltimore)* 1984;63:189-200.
66. Wang EEL, Prober CG, Ford-Jones L, Gold R. The management of central intravenous catheter infections. *Pediatr Infect Dis* 1984;3:110-3.
67. Prince A, Heller B, Levy J, Heird WC. Management of fever in patients with central vein catheters. *Ped Infect Dis* 1986;5:20-4.
68. Brun-Buisson CH, Abrouk F, Legrand P, Huet Y, Larabi S, Rapin M. Diagnosis of central venous catheter-related sepsis. Critical level of quantitative tip cultures. *Arch Intern Med* 1987;147:873-7.

- 
69. Hamory BH, Parisi JT, Hutton JP. *Staphylococcus epidermidis*: a significant nosocomial pathogen. Am J Infect Control 1987;15:59-74.
70. Lewis JA, Lafrance R, Bower RH. Treatment of an infected silicone right atrial catheter with combined fibrinolytic and antibiotic therapy: case report and review of the literature. JPEN 1989;13:92-8.
71. Capdevila JA, Planes AM, Palomar M, Gasser I, Almirante B, Pahissa A et al. Value of differential quantitative blood cultures in the diagnosis of catheter-related sepsis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992;11:403-7.
72. Krzywda EA, Andris DA, Edmiston CHE, Quebbeman EJ. Treatment of Hickman catheter sepsis using antibiotic lock technique. Infect Control Hosp Epidemiol 1995;16:596-8.
73. McCarthy A, Byrne M, Breathnach F, O'Meara A. "In-situ" teicoplanin for central venous catheter infection. Ir J Med Sci 1995;164:125-7.
74. Cleri DJ, Corrado ML, Seligman SJ. Quantitative culture of intravenous catheters and other intravascular inserts. J Infect Dis 1980;141:781-6.
75. McCarthy JT, Steckelberg JM. Infective endocarditis in patients receiving long-term hemodialysis. Mayo Clin Proc 2000;75:1008-14.
76. Arnow PM, Quimosing EM, Beach M. Consequences of intravascular catheter sepsis. Clin Infect Dis 1993;16:778-84.
77. Rosen AB, Fowler VG Jr, Corey GR, Downs SM, Biddle Ak, Li J et al. Cost-effectiveness of transesophageal echocardiography to determine the duration of therapy for intravascular catheter-associated *Staphylococcus aureus* bacteremia. Ann Intern Med 1999;130:810-20.

- 
78. Ragni MV, Hord JD, Blatt J. Central venous catheter infection in haemophiliacs undergoing prophylaxis or immune tolerance with clotting factor concentrate. *Haemophilia* 1997;3:90-5.
79. Nahass RG, Weinstein MP. Qualitative intravascular catheter tip cultures do not predict catheter-related bacteremia. *Diag Microbiol Infect Dis* 1990;13:223-6.
80. Cooper GL, Hopkins CC. Rapid diagnosis of intravascular catheter-associated infection by direct gram staining of catheter segments. *N Engl J Med* 1985;312:1142-7.
81. Centers for Disease Control and Prevention. Epidemiologic notes and reports. Nosocomial bacteremias associated with intravenous fluid therapy—USA. 1971. *Morb Mortal Wkly Rep* 1997;46:1227-33.
82. Kiehn TE, Gorey E, Brown AE, Edwards FF, Armstrong D. Sepsis due to *Rhodotorula* related to use of indwelling central venous catheters. *Clin Infect Dis* 1992;14:481-6.
83. Raad II, Vartivarian S, Khan A, Bodey GP. Catheter-related infections caused by the *Mycobacterium fortuitum* complex: 15 cases and review. *Rev Infect Dis* 1991;13:1020-5.
84. Brady MT, Marcon MJ, Maddux H. Broviac catheter-related infection due to *Mycobacterium fortuitum* in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Pediatr Infect Dis J* 1987;6:492-4.
85. Kiehn TE, Armstrong D. Changes in the spectrum of organisms causing bacteremia and fungemia in immunocompromised patients due to venous access devices. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990;9:869-72.

86. Stillman RM, Soliman F, García L, Sawyer PN. Etiology of catheter-associated sepsis. Correlation with thrombogenicity. *Arch Surg* 1977;112:1497-9.
87. Liñares J, Sitges-Serra A, Garau J, Pérez JL, Martín R. Pathogenesis of catheter sepsis: a prospective study with quantitative and semi-quantitative cultures of catheter hub and segments. *J Clin Microbiol* 1985;21:357-60.
88. Collignon PJ, Munro R. Laboratory diagnosis of intravascular catheter associated sepsis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989;8:807-14.
89. Moro ML, Vigano EF, Cozzi A. Risk factors for central venous catheter-related in surgical and intensive care units. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1994;15:253-64.
90. Guidet B, Nicola I, Barakett V, Gabillet JM, Snoey B, Petit JC et al. Skin versus hub cultures to predict colonization and infection of central venous catheter in intensive care patients. *Infection* 1994;22:43-8.
91. Melly MA, Meng HC, Schaffner W. Microbial growth in lipid emulsion used in parenteral nutrition. *Arch Surg* 1975;110:1479-81.
92. Widmer AF. IV related infections. A: Wenzel RP editor. *Prevention and Control of Nosocomial Infections*. Iowa: Williams and Wilkins editors, 1993;556-79.
93. Bouza E, Liñares J, Ena J. Infecciones asociadas a catéteres intravasculares. A: Comentarios a la literatura en enfermedades infecciosas. *Monografía* 1990;11-53.
94. Raad I, Costerton W, Sabharwal U, Sacilowski M, Anaissie E, Bodey GP. Ultrastructural analysis of indwelling vascular catheters: a quantitative relationship between luminal colonization and duration of placement. *J Infect Dis* 1993;168:400-7.



95. Daugherty SH. Pathobiology of infection in prosthetic devices. *Rev Infect Dis* 1988;6:1102-17.
96. Peters G, Schumarer-Perdreau F, Pulverger G. Fixation des microorganismes sur différents polymères. A: Postaire E. Les matières plastiques à usage pharmaceutique et médicochirurgical. Paris: Ed collection APHIF, Med Internat, 1986.
97. Atela I, Coll P, Rello J, Quintana E, Prats G, Barrio J et al. Serial surveillance cultures of skin and catheter hub specimens from critically ill patients with central venous catheters: molecular epidemiology of infection and implications for clinical management and research. *J Clin Microbiol* 1997;35:1784-90.
98. Locci R, Peters G, Pulverer G. Microbial colonization of prosthetic devices. III. Adhesion of staphylococci to lumina of intravenous catheters perfused with bacterial suspensions. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg (B)* 1981;173:300-7.
99. Peters G, Locci R, Pulverer G. Adherence of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *J Infect Dis* 1981;146:479-82.
100. Cooper GL, Schiller AL, Hopkins CC. Possible role of capillary action in pathogenesis of experimental catheter-associated dermal tunnel infections. *J Clin Microbiol* 1988;26:8-12.
101. Dealler S, Millar MR, Mackay P. Transdermal potential and bacterial colonization of intravascular catheters. *Lancet* 1988;i:703.
102. Franson TR, Sheth NK, Menon L, Sohnle PG. Persistent in vitro survival of coagulase-negative staphylococci adherent to intravascular catheters in the absence of conventional nutrients. *J Clin Microbiol* 1986;24:559-61.

- 
103. Gómez-García AC, Pérez-Giraldo C, Rodríguez-Benito A. Antimicrobianos y adherencia de estafilococos coagulasa-negativos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1996;14:261-6.
104. Chuard C, Vaudaux PE, Proctor RA, Lew DP. Decreased susceptibility to antibiotic killing of a stable small colony variant of *Staphylococcus aureus* in fluid phase and on fibronectin-coated surfaces. *J Antimicrob Chemother* 1997;39:603-8.
105. Proctor RA, Balwit JM, Vesga O. Variant subpopulations of *Staphylococcus aureus* as cause of persistent and recurrent infections. *Infect Agents Dis* 1994;3:302-12.
106. Vesga O, Groeschel MC, Otten MF, Brar DW, Vann JM, Proctor RA. *Staphylococcus aureus* small colony variants are induced by the endothelial cell intracellular milieu. *J Infect Dis* 1996;173:739-42.
107. Krafe-Jacobs B, Sivit CJ, Mejia R, Pollack MM. Catheter-related thrombosis in critically ill children comparison of catheters with and without heparin bonding. *J Pediatr* 1995;126:50-54.
108. Giraud MC, Alvarez-Schere V, Ponce de Leon S. Clinical significance of production of slime by coagulase-negative staphylococci (CNS) isolated from blood culture. A: program and abstracts of the 27<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (New York). Washington DC: American Society for Microbiology, 1987, abstract 1134.
109. Goldmann DA, Pier GB. Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization. *Clin Microb Rev* 1993;176-92.
110. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun* 1982;37:318-26.

111. Barker LP, Simpson WA, Christensen GD. Differential production of slime under aerobic and anaerobic conditions. *J Clin Microbiol* 1990;28:2578-9.
112. Farber BF, Wolff AG. Salicylic acid prevents the adherence of *E.coli* to silastic catheters. *J Urol* 1993;149:667-70.
113. Pascual A. Interacción entre microorganismos, materiales plásticos y antimicrobianos. A: León Gil C, coordinador. Conferencia de Consenso "Infección por catéter en UCI". Grupo de Trabajo de Enfermedades Infecciosas de la Sociedad Española de Medicina Intensiva y Unidades Coronarias. Madrid: Editorial Fernández,1996;25-34.
114. Gosbell IB. Central venous catheter-related sepsis: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, treatment and prevention. *Intens Care World* 1994;11:54-8.
115. Levy JH, Nagle DM, Curloing PE, Waller JL, Kopel M, Tobia V. Contamination reduction during central venous catheterization. *Crit Care Med* 1988;16:165-7.
116. Pascual A, Martínez-Martínez L, Ramírez de Arellano E, Perea EJ. Susceptibility to antimicrobials of *Pseudomonas aeruginosa* attached to siliconized latex urinary catheters. *Eur J Clin Microbiol* 1993;12:761-6.
117. Ramírez de Arellano E, Pascual Á, Martínez-Martínez L, Perea EJ. Actividad de antimicrobianos en biocapas de *Staphylococcus epidermidis* sobre catéteres de cloruro de polivinilo. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1995;13:581-6.
118. Martínez-Martínez L, Pascual A, Giglio MI, Perea EJ. Effect of subinhibitory concentrations of beta-lactams on the production of slime, surface hydrophobicity and adhesion of *Staphylococcus epidermidis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1991;9:543-6.

119. Dunne WM, Mason EO Jr, Kaplan SL. Diffusion of rifampin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:2522-6.
120. Capdevila JA. Current methods for the diagnosis of catheter-related bacteraemia. *Rev Med Microbiol* 1997;8:189-95.
121. Maki DG, Weise CE, Serafin HW. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N Engl J Med* 1977;296:1305-9.
122. Dooley DP, Garcia A, Kelly W, Longfield RN, Harrison L. Validation of catheter semiquantitative culture technique for nonstaphylococcal organisms. *J Clin Microbiol* 1996;34:409-12.
123. Collignon PJ, Munro R. Limitations of semiquantitative method for catheter culture. *J Clin Microbiol* 1988;26:1075-6.
124. Rello J, Coll P, Prats G. Evaluation of culture techniques for diagnosis of catheter-related sepsis in critically ill patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:1192-3.
125. Rello J. Diagnóstico de infección por catéter, 15 años después. *Med Clin (Barc)*1992;98:497-8.
126. Rello J, Coll P, Vallverdú I, Net A, Prats G. Infección por catéter en cuidados intensivos: estudio comparativo de dos técnicas de cultivo. *Med Intensiva* 1990; 14 (Extr.):33.
127. Seligman SJ. Quantitative intravenous catheter cultures identify focus of bacteremia. A: abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology. Washington DC: American Society for Microbiology, 1974; abstract M18.

128. Haslett TM, Isemberg HD, Hilton E, Tucci V, Kay BG, Vellozzi EM. Microbiology of indwelling central intravascular catheters. *J Clin Microbiol* 1988;26:696-701.
129. Liñares J, Pulido MA, Domínguez MA, Pérez JL. Diagnóstico microbiológico de la infección por catéter. A: León Gil C, coordinador. Conferencia de Consenso "Infección por catéter en UCI". Grupo de Trabajo de Enfermedades Infecciosas de la Sociedad Española de Medicina Intensiva y Unidades Coronarias. Madrid: Editorial Fernández, 1996;75-90.
130. Kristinsson KG, Burnett JA, Spencer RC. Evaluation of three methods for culturing long intravascular catheters. *J Hosp Infect* 1989;14:183-91.
131. Sheretz RJ, Raad II, Balani A. Three year experience with sonicated vascular catheter cultures in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 1990;28:76-82.
132. Padberg FT Jr, Smith SM, Eng RH. Optimal method for culturing vascular prosthetic grafts. *J Surg Res* 1992;53:384-390.
133. Liñares J, Sitges-Serra A, Martín R. Rapid diagnosis of catheter-related sepsis in total parenteral nutrition (TPN). A: program and abstracts of the 27th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (New York). Washington DC: American Society for Microbiology, 1987; abstract 113.
134. McCarthy LR, Senne JE. Evaluation of acridine orange stain for detection of microorganism in blood cultures. *J Clin Microbiol* 1980;11:281-5.
135. Coullée F, Lemieux C, Paradis JF. Value of direct catheter staining in the diagnosis of intravascular-catheter-related infection. *J Clin Microbiol* 1988;26:1088-90.
136. Collignon P, Chan R, Munro R.. Rapid diagnosis of intravascular catheter-related sepsis. *Arch Intern Med* 1987;147:1609-12.

137. Liñares J, Sitges-Serra A, Martín R. Rapid diagnosis of catheter related sepsis in total parenteral nutrition (TPN). A: program and abstracts of the 27<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (New York). Washington DC: American Society for Microbiology, 1987; abstract 1131.
138. Snyderman DR, Gorbea HF, Pober BR, Majka JA, Murray SA, Perry LK. Predictive value of surveillance skin cultures in total-parenteral-nutrition-related infection. *Lancet* 1982;ii:1385-8.
139. Capdevila JA., Gavaldà J, Pahissa A. Antibiotic-lock technique: usefulness and controversies. *Antimicrob Infect Dis Newsletter. AIDIEX* 1996;15:9-13.
140. Rushforth JA, Hoy CM, Kite P, Puntis JW. Rapid diagnosis of central venous catheter sepsis. *Lancet* 1993;342:402-3.
141. Moonens F, el Alami S, Van Gossum A, Struelens MJ, Serruys E. Usefulness of gram staining of blood collected from total parenteral nutrition catheter for rapid diagnosis of catheter-related sepsis. *J Clin Microbiol* 1994; 32:1578-9.
142. Fan ST, Teoh-Chan CH, Lau KF. Evaluation of central venous catheter sepsis by differential quantitative blood culture. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989;8:142-4.
143. Wing EJ, Norden CW, Shaddock RK, Winkelstein A. Use of quantitative bacteriologic techniques to diagnose catheter-related sepsis. *Arch Intern Med* 1979;139:482-3.
144. Capdevila JA, Segarra A, Planes AM, Ramírez-Arellano M, Pahissa A, Piera L et al. Successful treatment of haemodialysis catheter-related sepsis without catheter removal. *Nephrol Dial Transplant* 1993;8:231-4.

145. Flynn PM, Shenep JL, Strokes DC, Barrett FF. Management of confirmed central venous catheter-related bacteremia. *Pediatr Infect Dis* 1987;6:729-34.
146. Douard MC, Arlet G, Leverger G, Paulien R, Waintrop C, Clementi E et al. Quantitative blood cultures for diagnosis and management of catheter-related sepsis in pediatric hematology and oncology patients. *Intensive Care Med* 1991;17:30-5.
147. Whimbey E, Wong B, Kiehn TE, Armstrong D. Clinical correlations of serial quantitative blood cultures determined by lysis-centrifugation in patients with persistent septicemia. *J Clin Microbiol* 1984;19:766-71.
148. Flynn PM, Shenep JL, Barrett FF. Differential quantitation with a commercial blood culture tube for diagnosis of catheter-related infection. *J Clin Microbiol* 1988;26:1045-6.
149. Markus S, Buday S. Culturing indwelling central venous catheters in situ. *Infect Surg* 1989:157-62.
150. Kite P, Dobbins BM, Wilcox MH, Fawley WN, Kindon AJ, Thomas D et al. Evaluation of a novel endoluminal brush method for in situ diagnosis of catheter-related sepsis. *J Clin Pathol* 1997;50:278-82.
151. Fortún J. La decisión de retirar o mantener un catéter central infectado. *Rev Clin Esp* 1998;198:637-9.
152. Atela I, Coll P, Rello J, Quintana E, Barrio J, March F et al. Serial surveillance cultures of skin and catheter hub specimens from critically ill patients with central venous catheters: molecular epidemiology of infection and implications for clinical management and research. *J Clin Microbiol* 1997;35:1784-90.

153. Henderson DK. A: Mandell, Douglas and Bennett's, editors. Chap 292: Infections due to percutaneous intravascular devices. Principles and Practice of Infectious Diseases. 5<sup>a</sup> Edició. Philadelphia: Churchill Livingstone editors, 2000;3005-20.
154. Centers for Disease Control Working Group. Guidelines for prevention of intravenous therapy-related infections. Infect Control 1981;3:62-79.
155. Benezra D, Kiehn TE, Gold JW, Brown AE, Turnbull AD, Armstrong D. Prospective study of infections in indwelling central venous catheters using quantitative blood culture. Am J Med 1988;85:495-8.
156. Broviac JW, Cole JJ, Scribner BH. A silicone rubber atrial catheter for prolonged parenteral alimentation. Surg Gynecol Obstet 1973;136:602-6.
157. Hickman RO, Buckner CD, Clift RA, Sanders JE, Stewart P, Thomas ED. A modified right atrial catheter for access to the venous system in marrow transplant recipients. Surg Gynecol Obstet 1979;148:871-5.
158. Byrne WJ, Halpin TC, Asch MJ, Fonkalsrud EW, Ament ME. Home total parenteral nutrition: an alternative approach to the management of children with severe chronic small bowel disease. J Pediatr Surg 1977;12:359-66.
159. Prince AS, Heller B, Heird W. Antibiotic treatment of catheter sepsis. A: 23<sup>rd</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Las Vegas). Washington DC: American Society for Microbiology, 1983.
160. Bouza E. Tratamiento de las infecciones de los catéteres endovasculares. A: León Gil C, coordinador. Sociedad Española de Medicina Intensiva y Unidades Coronarias. Grupo de Trabajo de Enfermedades Infecciosas. Conferencia de Consenso "Infección por catéter en UCI". Madrid. Editorial Fernández, 1996;117-23.



- 
161. Jernigan JA, Farr BM. Short-course therapy of catheter-related *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Ann Intern Med* 1993;119:304-11.
162. Cluff LE, Reynolds RC, Page DL, Breckenridge JL. Staphylococcal bacteremia and altered host resistance. *Ann Intern Med* 1968;69:859-73.
163. Finkelstein R, Sobel JD, Nagler A, Merzbach D. *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis: comparison of nosocomial and community-acquired infection. *J Med* 1984;15:193-211.
164. Nolan CM, Beaty HN. *Staphylococcus aureus* bacteremia. Current clinical patterns. *Am J Med* 1976;60:495-500.
165. Mylotte JM, Beam TR Jr, Allen JC. *Staphylococcus aureus* bacteremia: a prospective study. *South Med J* 1983;76:1131-5.
166. Tebbs SE, Veale EL, Elliot TSJ. A comparison of the in-vitro activity of amphotericin B with that of liposomal amphotericin B against *Candida albicans* colonising central venous catheters. *J Antimicrob Chemother* 1994;34:840-1.
167. Lawson M, Bottino JC, Hurtubise MR. The use of urokinase to resolve the patency of occluded central venous catheters. *Am J Intraven Ther Clin Nutr* 1982;32:29-30.
168. La quaglia MP, Caldwell C, Lucas A, Corbally M, Heller G, Steinherz L et al. A prospective randomized double-blind trial of bolus urokinase in the treatment of established Hickman catheter sepsis in children. *J Clin Ped Surg* 1994;742-5.
169. Henrickson KJ, Dunne WM Jr. Modification of central venous catheter flush solution improves in vitro antimicrobial activity. *J Infect Dis* 1992;166:944-6.

170. Ruggiero R, Aisenstein T. Central catheter fibrin sleeve: heparin effect. *JPEN* 1983;7:270-3.
171. Montseny JJ, Eladari D, Chawki M, Meyrier A. Teicoplanine-heparin lock for permanent tunnelized hemodialysis catheters infected with staphylococcus. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:A184.
172. Matuchansky C, Messing B, Jeejeebhoy KN, Beau P, Beliah M, Allard JP. Cyclical parenteral nutrition. *Lancet* 1992;340:588-92.
173. Elian JC, Frappaz D, Ros A, Gay JP, Guichard D, Dorche G et al. Étude de la cinétique sérique de la vancomycine au décours de la technique de "blocage in situ". *Arch Fr Pediatr* 1992;49:357-60.
174. Cowan CE. Antibiotic lock technique. *J Intraven Nurs* 1992;15:283-7.
175. Gaillard JL, Merlino R, Pajot N, Goulet O, Fauchere JL, Ricour C et al. Conventional and nonconventional modes of vancomycin administration to decontaminate the internal surface of catheters colonized with coagulase-negative staphylococci. *JPEN* 1990;14:593-5.
176. Joly V, Belmatoug N, Sibert A, Carbon C, Yeni P. Antibiotic-lock technique for the treatment of central venous catheter infections. *Clin Infect Dis* 1996;23:418-9.
177. Merlino R, Gaillard JL, Fauchere JL, Chaumont P, Droy-Lefaix MT, Descamps P et al. In vitro quantitative model of catheter infection during simulated parenteral nutrition. *J Clin Microbiol* 1988;26:1659-64.
178. Pérez JL. Bases microbiológicas para el tratamiento de la sepsis asociada a catéteres. Tesis doctoral. Barcelona: Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona, 1990.

179. Pascual A, Ramírez de Arellano E, Perea EJ. Activity of glycopeptides in combination with amikacin or rifampin against *Staphylococcus epidermidis* biofilms on plastic catheters. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:515-7.
180. Domagk G. Ein Beitrag zur chemotherapie der bakteriellen infektionen. *D Med Wschr* 1935;61:250-3. Citat a: Classics in infectious diseases. A contribution to the chemotherapy of bacterial infections. Gerhard Domagk, 1935. *Rev Infect Dis* 1986;8:163-6.
181. Abraham EP. Fleming's discovery. *Rev Infect Dis* 1980;2:140-1.
182. Zak O, Sande MA. Introduction: the role of animal models in the evaluation of new antibiotics. A: Zak O, Sande MA, editors. *Experimental models in antimicrobial chemotherapy*. Volum 1. London:Academic Press, 1986;1-5.
183. Zak O. Scope and limitations of experimental chemotherapy. *Experientia* 1980;36:479-83.
184. O'Grady F. Animal models in the assessment of antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother* 1976;2:1-3
185. Beskid G, Christenson JG, Cleeland R, DeLorenzo Town PW. In vitro activity of ceftriaxone (Ro 13-9904), a new broad-spectrum semisynthetic cephalosporin. *Antimicrob Agents Chemother* 1981;20:159-67.
186. Volegman B, Gudmundsson S, Urnide J, Legget J, Craig WA. In vivo postantibiotic effect in a thigh infection in neutropenic mice. *J Infect Dis* 1988; 157:287-98.
187. Zak O, O'Reilly T. Animal models as predictors of the safety and efficacy of antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990;9:472-8.

188. Cleeland R, Squires E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. A: Lorian V. editor. Antibiotics in laboratory medicine. 3th edition. Baltimore: The Willians & Wilkins Co,1991;739-86.

189. Dalhoff A, Ullman U. Correlation between pharmacokinetics, pharmacodynamics and efficacy of antibacterial agents in animal models. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1990;9:479-87.

190. Scheld WM. Experimental animal models of bacterial meningitis. A: Zak O, Sande MA, editors. Experimental models in antimicrobial chemotherapy. Volumen 1. London: Academic Press,1986;139-86.

191. Schweizerische Akedemie der Medizinischen Wissenschaften und Schweizerische Naturforschende Gesellschaft. Ethische Grundsätze und Richtlinien für Wissenschaftliche Tierversuche. Schweizerische Aerztezeitung/Bulletin des Médecins Suisses 1983;64:943-6.

192. Sánchez González MA. Experimentación y derechos de los animales: su historia y fundamentos éticos. Med Clin (Barc) 1990;95:217-20.

193. Council of Europe. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. European Treaty Seies. Nº 123. Strasbourg: Council of Europe,1986;1-51.

194. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Real Decreto 223/1988. 14 de Marzo de 1988. Boletín Oficial del Estado N67 18-03-1988.

195. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Orden de 13 de Octubre de 1989. Boletín Oficial del Estado N250 18-10-1989.

196. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Instrumento de Ratificación del Convenio Europeo. Boletín Oficial del Estado N256 25-10-1990.

197. Presidència de la Generalitat de Catalunya. Llei 5/1995 de 21 de juny de protecció dels animals utilitzats per a experimentació i per a altres finalitats científiques. Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya N2073;5172-5.

198. Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca. Decret 214/1997 de 30 de juliol pel qual es regula la utilització d'animals per a experimentació i per a altres finalitats científiques. Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya N2450;9169-74.

199. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests on bacteria that grow aerobically. 4<sup>th</sup> edition. Approved standard M7-A4. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.

200. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Proposed guideline. Standard 26-P. Villanova, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1987.

201. Sahm DF, Torres C. Effects of medium and inoculum variations on screening for high-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus faecalis*. J Clin Microbiol 1988;26:250-6.

202. Anhalt JP. Antimicrobial assays. A: Washington II editor. Laboratory Procedures in Clinical Microbiology. New York: Springer-Verlag, 1985;691-729.

203. Colton T. Estadística descriptiva. A: Colton T editor. Estadística en medicina. Barcelona: Salvat editores, 1991;11-64.

204. Colton T. Métodos no paramétricos A: Colton T editor. Estadística en Medicina. Barcelona: Salvat editores, 1991;227-36.

205. Bayston R. A model of catheter colonisation in vitro and its relationship to clinical catheter infections. *J Infect* 1984;9:271-6.
206. Ramírez E, Pascual A, Martínez-Martínez L, Perea EJ. Actividad de antimicrobianos sobre biocapas de *Staphylococcus epidermidis*. *Rev Esp Quimioter* 1992;5:249-54.
207. Peters G, Locci R, Pulverer G. Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *J Infect Dis* 1982;146:479-82.
208. Baquero F. Bases teóricas de la determinación de la susceptibilidad a antimicrobianos. A: Casal M editor. Métodos de estudio de la actividad de los antimicrobianos. Granada: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Granada, 1995:11-24.
209. Drusano GL. Role of pharmacokinetics in the outcome of infections. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:289-97.
210. Blaser J, Vergères P, Widmer AF, Zimmerli W. In vivo verification of in vitro model of antibiotic treatment of device-related infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1134-9.
211. Eng RHK, Padberg FT, Smith SM, Tan EN, Cherubin CE. Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1824-8.
212. Chuard C, Vaudaux P, Waldvogel FA, Lew DP. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* growing on fibronectin-coated surfaces to bactericidal antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:625-32.
213. Widmer AF, Frei R, Rajacic Z, Zimmerli W. Correlation between in vivo and in vitro efficacy of antimicrobial agents against foreign body infections. *J Infect Dis* 1990;162:96-102.

214. Anthony TU, Rubin LG. Stability of antibiotics used for antibiotic-lock treatment of infections of implantable venous devices (Ports). *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2074-6.
215. Gómez-García AC, Pérez Giraldo A, Rodríguez-Benito A. Antimicrobianos y adherencia de estafilococos coagulasa-negativos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1996;14:261-6.
216. Barg NL, Supena RB, Fekety R. Persistent Staphylococcal bacteremia in an intravenous drug abuser. *Antimicrob Agents Chemother* 1986;29:209-11.
217. Malcomson C, Zilka S, Saum J, Moore G, Deeks T. Investigations into compatibility of teicoplanin with heparin. *Eur J Par Sci* 1997;2:51-5.
218. Henrickson KJ, Powell KR, Schwartz CL. A dilute solution of vancomycin and heparin retains antibacterial and anticoagulant activities. *J Infect Dis* 1988;157:600-1.
219. Liñares J, Sitges-Serra A, Garau J et al. Pathogenesis of catheter sepsis. A prospective study with quantitative and semiquantitative cultures of catheter hub and segments. *J Clin Microbiol* 1985;21:357-360.
220. Tenney JH, Moody MR, Newmann KA, Schimpff SC, Wade JC, Costerton JW et al. Adherent microorganisms on luminal surface of long term intravenous catheters. Importance of *Staphylococcus epidermidis* in patients with cancer. *Arch Intern Med* 1986;146:1949-54.
221. Ulphani JS, Rupp ME. Model of *Staphylococcus aureus* central venous catheter-associated infection in rats. *Lab Sci* 1999;49:283-7.
222. Ruiz-Valverde MP, Barberà JR, Segarra A, Capdevila JA, Evangelista A, Piera L. Successful treatment of catheter-related sepsis and extraluminal catheter thrombosis with Vancomycin and Fraxiparin without catheter removal. *Nephron* 1997;5:354-5.

223. Moffie BG, Mouton RP. Sensitivity and resistance of *Legionella pneumophila* to some antibiotics and combination of antibiotics. J Antimicrob Chemother 1988;2:457-62.
224. Norden CW. Experimental osteomyelitis. IV. Therapeutic trials with rifampin alone and in combination with gentamicin, sisomicin, and cephalotin. J Infect Dis 1975;132:493-9.
225. Chamovitz B, Bryant RE, Gilbert DN, Harstein AI. Prosthetic valve endocarditis caused by *Staphylococcus epidermidis*. Development of rifampin resistance during vancomycin and rifampin therapy. JAMA 1985;253:2867-8.
226. Simon GL, Smith RH, Sande MA. Emergence of rifampin resistant strains of *Staphylococcus aureus* during combination therapy with vancomycin and rifampin: a report of two cases. Rev Infect Dis 1983 (Suppl 3):507-8.
227. Raad I, Darouiche R, Hachem R, Sacilowski M, Bodey GP. Antibiotics and prevention of microbial colonization of catheters. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:2397-400.
228. Cagni A, Chuard C, Vaudaux PE, Schrenzel J, Lew DP. Comparison of sparfloxacin, temafloxacin, and ciprofloxacin for prophylaxis and treatment of experimental foreign-body infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:1655-60.
229. Tshefu K, Zimmerli W, Waldvogel FA. Short term administration of rifampin in the prevention or eradication of infection due to foreign bodies. Rev Infect Dis 1983;5:S474-S80.
230. Archer GL, Johnston JL, Vazquez GJ, Haywood HB III. Efficacy of antibiotic combinations including rifampin against methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*: in vitro and in vivo studies. Rev Infect Dis 1983; 5:S538-S42.



231. Ein ME, Smithe NF, Aruffo JF, Heerema MS, Bradshaw MW, Williams TW Jr. Susceptibility and synergy studies of methicilin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1979;16:655-9.

232. Obst G, Gagnon RF, Harris A, Prentis J, and Richards GK. The activity of Rifampin and analogs against *Staphylococcus epidermidis* biofilms in a CAPD environment model. *Am J Nephrol* 1989;9:414-20.

233. Simon VC, Simon M. Antibacterial activity of teicoplanin and vancomycin in combination with rifampicin, fusidic acid or fosfomicin against staphylococci on vein catheters. *Scand J Infect Dis Suppl* 1990;72:14-9.