

TESIS DOCTORAL

DESARROLLO POSTOXICOLOGICO Y PRETERAPEUTICO
DE UNA CEFAMICINA EN ESPAÑA

LORENZO AGUILAR ALFARO

Director: Prof. Dr. D. JOSÉ PRIETO PRIETO
Departamento de Microbiología
Facultad de Medicina
Universidad Complutense
Madrid

Madrid, 1.993



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
28040 MADRID

Prof. Dr. D. JOSE PRIETO PRIETO, Catedrático de Microbiología,
Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense
de Madrid,

CERTIFICA QUE: D. LORENZO AGUILAR ALFARO, Licenciado en Medicina
y Cirugía, y Especialista en Microbiología y Parasitología, ha realizado bajo mi
dirección el trabajo "Desarrollo postoxicológico y preterapéutico de una
cefamicina en España", el cual puede ser defendido como Tesis Doctoral.

Fdo. J. Prieto

A Gloria presente, a Gloria futura y a Asunción

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Dr. José Prieto (Dpto. Microbiología, Facultad de Medicina, Univ. Complutense de Madrid), por su constante estímulo y confianza a lo largo del desarrollo de esta tesis.

A Ignacio P. Balcabao (Dpto. Microbiología, H.M.C. Gómez Ulla, Madrid), por su ilusión y nuestro trabajo constante en común en diferentes campos microbiológicos, especialmente con respecto a farmacodinamia de antibióticos como parte de esta investigación.

Al Dr. Ignacio A. Cantalapiedra (Dpto. Medicina Preventiva, Facultad de Medicina, Madrid), por su paciencia, amistad, compañerismo y generosidad a lo largo del análisis estadístico de los datos.

Al Prof. Dr. David Greenwood (Antimicrobial Sciences, Queen's Medical Centre, Nottingham, UK), por el interés tomado en la exhaustiva revisión crítica del ensayo clínico fase I.

A mis compañeros, Dr. Antonio Carcas (Dpto. Farmacología Clínica, Hospital La Paz; Dpto. Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, UAM; Madrid), M^a José Giménez (Dpto. Médico-Investigación Clínica, SmithKline Beecham), Pablo Avilés (Dpto. de Investigación, Glaxo), y Pilar Coronel (Dpto. de Investigación Clínica, Tedec Meiji), por sus interesantes comentarios a esta tesis, o a los distintos estudios, a lo largo de su desarrollo.

A la Dra. Gloria Fdez.-Mayoralas (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid), por su participación desinteresada en este campo tan lejano al suyo.

INDICE

	Pg
I. INTRODUCCION.	9
1. Introducción general. Situación de la problemática.	10
1.1. Desarrollo general de antimicrobianos.	10
1.2. Fases de desarrollo posttoxicológico.	13
1.2.1. Area microbiológica.	14
1.2.2. Area farmacológica preterapéutica.	17
1.2.3. Area de ensayos clínicos terapéuticos.	19
1.3. Predicción de eficacia.	22
1.3.1. Factores microbiológicos.	24
1.3.2. Factores farmacocinéticos.	30
1.3.3. Factores farmacodinámicos.	35
1.3.4. Factores del huésped.	40
2. Cefminox.	42
2.1. Información sobre el mecanismo de acción.	42
2.2. Información previa del producto.	43
2.2.1. Aspectos microbiológicos.	43
2.2.2. Farmacología experimental.	44
2.2.3. Farmacología humana.	45
II. OBJETIVOS.	46
III. MATERIAL Y METODOS.	50
1. Centros, Investigadores y Estudios del Programa.	51
2. Antibióticos utilizados.	51
3. Cepas utilizadas.	52
4. Métodos utilizados.	53
4.1. Estudios microbiológicos.	54
4.2. Modelo animal.	57
4.3. Ensayo Clínico en Fase I.	57
4.3.1. Farmacocinética y farmacodinamia.	57
4.3.2. Inmunomodulación.	61
5. Análisis estadístico.	62
5.1. Efecto temporal sobre la biomasa.	62
5.2. Actividad bactericida.	63
5.3. Modelo animal.	63
5.4. Ensayo Clínico en Fase I.	66
5.4.1. Farmacocinética y farmacodinamia.	66

5.4.2. Inmunomodulación.	67
IV. RESULTADOS.	68
1. Actividad bacteriostática.	69
2. Actividad bactericida (viabilidad).	70
2.1. Modulación por el tamaño del inóculo.	71
2.2. Modulación por la osmolaridad ambiental.	72
2.3. Velocidad de acción bactericida.	75
2.4. Efecto del suero humano.	76
2.5. Efecto postantibiótico.	77
3. Actividad bacteriolítica.	78
4. Efecto de concentraciones subinhibitorias.	81
5. Efectos morfológicos celulares.	81
6. Consumo "in vitro" de antibiótico.	84
7. Actividad "in vivo": modelo animal discriminativo.	86
7.1. Eficacia "in vivo".	86
7.2. Predicción de eficacia por índices farmacodinámicos estáticos.	88
7.3. Dinámica de la modulación: dosis-respuesta.	91
8. Ensayo Clínico Fase I.	94
8.1. Seguridad.	94
8.2. Farmacocinética.	94
8.3. Farmacodinamia I. Actividad bactericida sérica.	94
8.4. Farmacodinamia II. Inmunomodulación.	97
9. Resumen del desarrollo posttoxicológico y preterapéutico, y de sus resultados.	99
9.A. Descripción y predicción de la actividad "in vitro".	99
9.B. Descripción y predicción de la actividad "in vivo". Modelo animal.	107
9.C. Descripción y predicción de la farmacocinética y farmacodinamia. EC Fase I.	111
V. DISCUSION	114
1. Actividad "in vitro"/Estudios microbiológicos.	117
1.1. Espectro.	119
1.2. Resistencia.	123
1.3. Actividad bactericida.	128

1.4. Mecanismo de acción.	132
1.5. Efecto de concentraciones subinhibitorias.	135
1.6. Efecto postantibiótico.	138
1.7. Interacciones con otros antimicrobianos.	139
2. Actividad "in vivo". Modelos animales.	140
2.1. Eficacia. Estudio dosis-respuesta.	141
2.2. Discrepancia "in vivo"/"in vitro".	141
2.3. Método de predicción de eficacia.	143
3. Ensayo Clínico Fase I.	146
3.1. Farmacocinética.	147
3.2. Farmacodinamia.	148
3.2.1. Actividad bactericida sérica.	148
3.2.2. Inmunomodulación.	151
4. Desarrollo clínico. Predicción de eficacia.	153
VI. CONCLUSIONES.	157
VII. BIBLIOGRAFIA.	161
VIII. TABLAS.	182
IX. GRAFICOS.	221

La evaluación y desarrollo de un nuevo fármaco es en realidad un proceso multidisciplinario, que no sólo involucra a microbiólogos e infectólogos sino también a bioquímicos, toxicólogos y, de forma importante, a bioestadísticos. Es además obvio que el éxito y desarrollo óptimo de un nuevo agente antimicrobiano requiere una cooperación estrecha entre científicos académicos, científicos en las compañías farmacéuticas y expertos médicos en las agencias de regulación.

S.R.Norrby. Symposium on Antibiotic Policies. Organised by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Held 25-27 March 1990 in Vienna.

Entre los numerosos fármacos a nuestra disposición, la predicción de eficacia clínica pre-ensayo debería ser la más simple para los agentes antimicrobianos.la validez de estas asunciones simplistas.....

F.W.O'Grady and A.Percival. Preface of "Prediction and Assesment of Antibiotic Clinical Efficacy" (Eds.F.O'Grady & A.Percival). Academic Press, London and Orlando, 1986.

Los clinicos demandan una guía clara sobre si un antimicrobiano, si es administrado, curará la infección sin dañar al paciente. La demanda es simple, pero la solución no, y no hay politico más evasivo que el microbiólogo encarando la cuestión de si un antibiótico ejercerá el efecto deseado.

D.Greenwood. Coloquia on Aspects of Infection. The Medical Society of London. Held 26-28 September 1984 in London.

ABREVIATURAS

1. Antibióticos.

- AMK. Amikacina.
- AMP. Ampicilina.
- AZT. Aztreonam.
- CFX. Cefoxitina.
- CFU. Cefuroxima.
- CMX. Cefminox.
- CTD. Ceftacidima.
- CTT. Cefotetan.
- CTX. Cefotaxima.
- CTZ. Ceftizoxima.
- IMP. Imipenem.
- PIP. Piperacilina.

2. Parámetros microbiológicos y farmacológicos.

- AUBC. Area Bajo Curva de Poderes Bactericidas.
- AUC. Area Bajo Curva.
- CLM. Concentración Lítica Mínima.
- CMA. Concentración Mínima Antibiótica.
- CMB. Concentración Mínima Bactericida.
- CMB_{6h}. Tras 6 horas de incubación.
- CMI. Concentración Mínima Inhibitoria.
- CMI_{IG}. Realizada con Inóculo Grueso.
- CMI_{MC}. Realizada en Medio Completo.
- CMI_{MCIG}. CMI realizada en Medio Completo con Inóculo Grueso.
- CMI_T. CMI turbidimétrica.
- PAE. Efecto Post-Antibiótico.
- PBS. Poder Bactericida del Suero.
- PBP. Proteínas Fijadoras de Penicilina.
- T/TSA. Tiempo (expresado en n° de vidas medias) de nivel sérico sobre el valor de un TSA determinado, en la fase beta.
- TSA. Test de Susceptibilidad Antibiótica.
- t_{1/2}. Vida(s) media(s).
- t/TSA. Tiempo (en horas) interdosis del nivel sérico sobre el valor de un TSA determinado.
- ufc. Unidades formadoras de colonias.

3. Otros.

- ATCC. American Type Culture Collection.
- DE. Dosis efectiva.
- EC. Ensayo(s) clínico(s).
- FDA. Food and Drug Administration.
- IDSA. Infectious Diseases Society of America.
- HPLC. High Performance Liquid Chromatography.
- NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- PMN. Leucocito(s) Polimorfonuclear(es).

Nota:

- Los subíndices expresan tanto por ciento. En el caso de DE el % de animales. En el caso de CMI el % de cepas. En el caso de CLM el % de decremento de densidad óptica.

I . INTRODUCCION

1. INTRODUCCIÓN GENERAL. SITUACIÓN DE LA PROBLEMÁTICA.

El descubrimiento o síntesis, investigación y desarrollo de un nuevo medicamento para el uso humano es un proceso complejo que requiere la integración de necesidades científicas, clínicas y comerciales (1).

1.1. Desarrollo general de antimicrobianos.

El desarrollo clínico de antimicrobianos, al igual que el de otros medicamentos, es dividido en las clásicas fases I a IV, las cuales están sujetas a la aprobación de las agencias de regulación.

La fase I es la primera administración a voluntarios sanos, aunque en algunas revisiones se considere dentro de dicha fase el desarrollo preclínico (1), superponiéndose, a veces, temporalmente ambas subfases. Los requerimientos mínimos de la C.E.E. antes de los estudios clínicos, incluyendo la administración a voluntarios sanos son:

1. Farmacología general.
2. Análisis microbiológico "in vitro" e "in vivo" que soporte la continuación del desarrollo.
3. Farmacocinética animal.
4. Toxicidad aguda (en dos especies de mamíferos, una de ellas no perteneciente a los roedores o lagomorfos).
5. Toxicidad crónica (al menos 14 días de duración).
6. Test de mutagenicidad (al menos 1 claramente negativo).
7. Datos químicos y farmacéuticos.

Dejando aparte los aspectos toxicológicos, nos centraremos en el desarrollo posterior a los mismos y previo a la administración del fármaco a pacientes, desarrollo posttoxicológico y preterapéutico sobre el que versa esta tesis.

Concatenando con el segundo punto de dichos requerimientos,

la comprobación de la actividad antibiótica "in vivo" (modelos animales) ha sido reconocida como una unión indispensable entre la demostración de la actividad "in vitro" y EC en pacientes (2). A pesar del importante papel que juegan en la evaluación de nuevos antibióticos, tanto para investigadores en la industria farmacéutica como para clínicos y, presumiblemente cada vez más, para las autoridades de las agencias de regulación (2), sólo las recomendaciones editadas por la Organización Mundial de la Salud sobre desarrollo preclínico de fármacos antimicrobianos (3) comentaban algo sobre modelos animales de infección antes de 1993.

El objetivo del modelo animal como nexo de unión "in vitro"/"in vivo", se basa en la correlación de la farmacocinética con la eficacia terapéutica siempre que se tengan en cuenta parámetros farmacodinámicos (4). Lógicamente, la identificación de estos parámetros influirá, junto con las clásicas pruebas "in vitro" y la farmacocinética en voluntarios sanos, en la dosificación (5) para EC con la finalidad de comprobar la eficacia del antibiótico en la enfermedad establecida en pacientes.

Estos parámetros farmacodinámicos pueden estudiarse desde tres puntos de vista. Uno, "in vitro", como la interacción cinética del antibiótico y la bacteria (su diana); otro, como expresión matemática de la distintas interrelaciones de parámetros farmacocinéticos (datos "in vivo") y microbiológicos (datos "in vitro"); y, un tercero, como la acción "ex vivo" del fármaco sobre sus dianas. Como ejemplos del primer enfoque podemos citar el PAE y la actividad bactericida concentración dependiente (4), resultantes de la variación en la cantidad de antibiótico, o el efecto inóculo (6) como resultante de la variación en la cantidad de unidades celulares bacterianas. Como ejemplos del segundo enfoque tenemos las clásicas relaciones AUC/CMI o nivel en el pico sérico/CMI (7). Finalmente, como ejemplo del tercer enfoque medimos las variaciones de la acción del antibiótico a lo largo del tiempo (dependiendo de sus

concentraciones decrecientes "in vivo") sobre la bacteria (con una susceptibilidad al antibiótico determinada "in vitro") a través de la determinación "ex vivo" de los PBS (8), expresando farmacodinámicamente la relación del nivel de actividad bactericida y tiempo mediante el AUBC. También podemos constatar la actividad del antibiótico "ex vivo" sobre el sistema inmune (9), como por ejemplo, las funciones de los polimorfonucleares (considerándolos como diana del medicamento) (10), extrayéndolos tras la exposición al antibiótico "in vivo" durante un tiempo determinado.

En el diseño del plan de desarrollo de un antibiótico, la etapa posttoxicológica y preterapéutica es de crucial importancia, pero temporalmente más corta que el desarrollo clínico en pacientes (fases II a IV). La especial relevancia de esta etapa en el campo de los antimicrobianos se debe a que la diana de éstos puede estudiarse "in vitro". La farmacocinética en voluntarios sanos nos dará el otro parámetro de la "ecuación de dosificación". Así, el concepto más antiguo y simplista era asegurar niveles séricos de antibiótico por encima de la CMI del organismo infectante, a lo largo del intervalo de dosificación para obtener la máxima eficacia (11)(12). Sin embargo, otros parámetros influyen en la eficacia, aisladamente o en conjunto, tanto desde el punto de vista farmacocinético, farmacodinámico o microbiológico, como veremos detenidamente a lo largo del desarrollo de la cefamicina CMX.

Todo ello complica actualmente el diseño, la ejecución y la interrelación de datos entre los distintos estudios para completar la fase posttoxicológica y preterapéutica. Para alguno de los agentes más antiguos la documentación de actividad antibacteriana, farmacología y eficacia no es muy extensa y probablemente no hubiese sido considerada suficiente en la actualidad por las agencias de regulación (13).

1.2. Fases del desarrollo posttoxicológico de un antimicrobiano.

Los requerimientos para estudios (EC) con antibióticos son menos estrictos que para muchos otros fármacos.

Norrby R (1984). Quality of Antibiotic Clinical Trials. J. Antimicrob. Chemoter. 14:205-208.

....en la base de datos para la creación de la guía de interpretación de los TSA... ..detallados datos de EC juegan un papel preponderante.

Hindler J A and Thrupp L D (1989). Interpretative Guidelines for Antimicrobial Susceptibility Test Results: What Do They Mean?. Clin. Microbiol. Newsl. 11:129-134.

La característica de exogenicidad al organismo humano, de la diana biológica a la que se dirigen los antibióticos, hace que, una vez superados los problemas de la vertiente toxicológica del proceso, todo el desarrollo previo a la comercialización del fármaco se dirija a la creación de una "guía de interpretación" de los TSA. Lógicamente, en la fase clínica se evaluará, además, la aparición de posibles efectos adversos del fármaco sobre el organismo.

Las categorías de susceptibilidad se establecen a lo largo del desarrollo posttoxicológico (preterapéutico y fases II y III) del antibiótico. Cada uno de los parámetros microbiológicos (poblacionales bacterianos), farmacológicos (y farmacodinámicos al relacionar parámetros "in vivo" e "in vitro") y de eficacia clínica (Ensayos Clínicos)(14), tiene distinta importancia dependiendo del fármaco específico y del grupo a que pertenece el microorganismo (15).

Siguiendo el razonamiento del párrafo anterior, los parámetros que utilizamos en el establecimiento de la guía de interpretación de los TSA, pueden clasificarse en tres grandes áreas (14), que son las fases (muchas veces concomitantes) del desarrollo posttoxicológico: área microbiológica, área farmacológica preterapéutica y área de EC terapéuticos.

1.2.1. Area microbiológica.

Tenemos que recordar que los antibióticos no son usualmente administrados por sus propiedades farmacológicas, sino por su efecto sobre los microorganismos invasores. Esto es una diferencia mayor entre los antibióticos y otros agentes terapéuticos.

R G Finch, en la discusión subsiguiente a la presentación de la ponencia "Are Clinical Trials Relevant to Antibiotic Evaluation?" (A Herzheimer). Dentro del Coloquio: Prediction and Assessment of Antibiotic Clinical Efficacy. The Medical Society of London, 26-28 de Septiembre de 1984.

Desde el punto de vista microbiológico, se ha definido el objetivo del TSA como la valoración del grado de actividad de un antimicrobiano contra un patógeno específico, sin tener en cuenta las numerosas variables clínicas que afectan al paciente (15). Para el laboratorio de investigación este objetivo puede parecer suficiente, pero evidentemente no nos dice nada sobre la capacidad de predicción de eficacia pre-EC. Los TSA "in vitro" están diseñados para determinar la CMI o CMB en una situación estática, donde idealmente están bien definidas y estandarizadas las condiciones del test (16). Un predeterminado número de microorganismos es introducido en un medio artificial de composición conocida en donde se establece una concentración constante de antibiótico y se incuba a una temperatura, pH y atmósfera constantes, por un período de tiempo también prefijado. El resultado del proceso "in vitro" es clasificado en unas categorías interpretativas de susceptibilidad (15), según unos límites de susceptibilidad o "breakpoints" (*). Estos se definen como criterios de decisión para categorizar a una cepa bacteriana como miembro de una clase de organismos con características de susceptibilidad antibiótica comunes (17), presuponiendo que dichas categorías servirán para objetivos terapéuticos (predicción de eficacia terapéutica) o epidemiológicos (predicción de aparición de resistencias).

(*) La palabra anglosajona "breakpoint" será utilizada a lo largo del texto como acepción de "límite, o punto de corte, de susceptibilidad antibiótica para la interpretación del TSA".

Las distintas categorías son (18)(19): sensible (tratamiento apropiado con la dosis recomendada para el tipo de infección y agente infectante), moderadamente sensible (posibilidad de inhibición con concentraciones conseguidas con dosis más altas o en zonas orgánicas donde los fármacos son fisiológicamente concentrados), susceptibilidad intermedia (categorización que previene la manifestación de discrepancias mayores en interpretación, derivadas de factores técnicos menores e incontrolados) y resistencia (ausencia de inhibición por las concentraciones sistémicas usualmente alcanzadas a partir de esquemas de dosificación habituales, o que caen en un rango donde cabe esperar mecanismos de resistencia específica por parte de la bacteria). La categorización depende de los límites de susceptibilidad; el "breakpoint" de sensibilidad debe reflejar la susceptibilidad intrínseca del aislamiento (ausencia de mecanismos de resistencia) y el "breakpoint" de resistencia debe reflejar el potencial farmacológico del fármaco (17).

Hoy por hoy, el factor microbiológico que interviene en el establecimiento de las categorías interpretativas de susceptibilidad es el factor inhibición, la CMI (15)(20). Un test cualitativo de difusión es en la actualidad totalmente cuantitativo y la zona de inhibición predirá la CMI (21). Estas zonas son medidas con < 0.5 mm. de precisión y ± 2 mm. de replicabilidad (22)(23).

Las mediciones cualitativas forman un continuo de valores que puede considerarse más preciso que la medición en base 2 de la CMI por dilución (la CMI real es generalmente menor que la leída y está sujeta a una replicabilidad de ± 1 dilución) (15). Los tests cuantitativos tienen fama de mayor sofisticación, pero los estudios existentes demuestran que el valor predictivo de los resultados de los tests cualitativos y cuantitativos es equivalente para la virtual totalidad de microorganismos y antibióticos (24).

Siendo básicos los puntos recomendados por la Organización

Mundial de la Salud para la investigación de antibacterianos (3), lo fundamental para el desarrollo preclínico es la investigación de la distribución poblacional bacteriana con respecto a la CMI (o diámetros de inhibición) (15), que puede adoptar distintos patrones (unimodal o bimodal con distintas curvas) dependiendo del fármaco y grupos de microorganismos.

Sólo hay una cosa clara con respecto a los "breakpoints", como describe irónicamente la British Society of Antimicrobial Chemotherapy (25), y es que son ampliamente arbitrarios y basados en consenso relacionado con consideraciones pragmáticas, al servir dos objetivos que pueden ser tan irreconciliables como la relevancia terapéutica y la reproductibilidad. Son tan arbitrarios como necesarios para el microbiólogo clínico, las agencias de regulación, la industria farmacéutica y los fabricantes de medios microbiológicos y discos de susceptibilidad (25).

Las nuevas recomendaciones del Grupo de Trabajo de la British Society of Antimicrobial Chemotherapy bajan la magnitud de los "breakpoints" que definen la categoría de susceptibilidad "sensible" (25). Este hecho quizá aumente el peso específico del factor microbiológico en la predicción de eficacia (que es menor para la categoría sensible que para la resistente (15)), sobre la base de la mejor identificación de los aislamientos totalmente sensibles (17)(26).

A pesar de que un programa para la determinación de la actividad antimicrobiana de un fármaco se formule con el principio de Wold (27) (incluir el máximo número de tests para obtener el máximo número de datos), los aspectos microbiológicos a estudiar recomendados por la OMS, previo paso o simultáneamente a la fase farmacológica, son (3): actividad frente a cepas estándar, actividad frente a aislados clínicos recientes, prevalencia de cepas resistentes in vitro, actividad comparativa con fármacos del mismo grupo, interacciones con otros antimicrobianos, selección de resistencia y resistencia cruzada.

Para el estudio de varios de estos aspectos, en vez de determinar la CMI a miles de bacterias resistentes, el uso de mutantes isogénicas, con mecanismos de resistencia bien definidos, puede obviar tiempo de utilización de laboratorio (28).

Dependiente del tipo de fármaco deben estudiarse facetas en particular, adaptadas al carácter de la sustancia a ensayar. Así, en el caso de los betalactámicos, la determinación poblacional de las CMI y el efecto inóculo deben complementarse con tests menos convencionales, como por ejemplo la actividad frente a bacterias metabólicamente latentes (28).

1.2.2. Area farmacológica preterapéutica.

.....hay escasa diferencia entre distintos agentes antimicrobianos, una vez probada la sensibilidad del microorganismo. Dado que la CMI relativa importe. Son la farmacología y farmacocinética de crucial importancia, especialmente en el huésped comprometido.

A M Geddes, en la discusión subsiguiente a la presentación "Protein Binding and Related Properties of Antibiotics and their Pharmacological and Clinical Relevance" (R Wise). Dentro del Coloquio: Prediction and Assessment of Antibiotic Clinical Efficacy. The Medical Society of London, 26-28 de Septiembre de 1984.

Desde el punto de vista del desarrollo preterapéutico, se pueden tomar una serie de asunciones, tanto desde la farmacología experimental como desde la farmacología clínica. Con respecto a esta última disciplina sería un error considerar que el valor de un TSA está basado en la relación nivel en el pico sérico y CMI. Esta asunción simplista no es estrictamente real y el nivel sérico en el pico es, únicamente, uno más de los parámetros de la farmacología clínica utilizados en la base de datos (15) para el establecimiento de los esquemas teóricos de dosificación.

Con respecto a la farmacología experimental, y estudiando qué factores son importantes desde el enfoque de la farmacocinética y/o farmacodinamia, cabe decir que diversos estudios en modelos animales relacionan con la eficacia terapéutica los siguientes parámetros: el nivel sérico con la CMI

(29), el AUC con la CMB (30), el tiempo que los niveles séricos están por encima de la CMI ($T(AUC/CMI)$) (31) y la concentración tisular (6). En la evaluación de estos parámetros se debe considerar, como veremos a lo largo de este trabajo, el tipo farmacodinámico de acción del fármaco "in vitro", ya sea éste concentración-dependiente o tiempo-dependiente.

Como vemos, la farmacología experimental, con sus modelos animales, nos permite estudiar la relación entre niveles séricos y/o tisulares con eficacia. Este hecho nos ayudará a establecer la dosis unitaria de un fármaco y la posibilidad de variar los intervalos entre dosis, orientándonos en el diseño de EC para la evaluación de la dosis óptima en diversos tipos de infecciones (5), siendo escalones esenciales en el desarrollo de una nueva entidad química (32).

Teniendo en cuenta que sólo el fármaco libre es eficaz, la unión a proteínas es un factor básico a estudiar (33), tanto desde el punto de vista de eficacia microbiológica (34), como farmacológico-experimental (la relación de este factor con la penetración tisular en modelos animales) (35) y farmacodinámico (midiendo la relación entre este parámetro y la eficacia terapéutica en modelos animales (36).

Lógicamente en humanos no es posible medir niveles tisulares en la fase I, dejando estas mediciones para fases posteriores del desarrollo clínico. Aún así, no sería ético realizar muestras seriadas de tejidos en el desarrollo de un fármaco (teniendo que conformarnos con su penetración a un tiempo determinado), por lo que, en la actualidad, no existe ningún estudio clínico que correlacione eficacia clínica y concentraciones tisulares, tanto en el desarrollo temprano como en el tardío de un fármaco (6). Así, en humanos, los niveles tisulares son de valor limitado en la determinación de la dosis unitaria e intervalo de dosificación en relación con la respuesta clínica, siendo los niveles séricos de fármaco libre en el valle y la vida media ($t_{1/2}$) en la fase beta de eliminación (6) los factores farmacológicos más

importantes para ser considerados.

Estos factores pueden ser estudiados en un fase I en voluntarios sanos, donde además evaluaremos la biodisponibilidad, el AUC, el fármaco activo eliminado por la orina y el metabolismo, como datos más importantes (37). Esta evaluación farmacocinética de nuevos antibióticos está particularmente dirigida a la creación de la base de datos que permitirá la generación de esquemas terapéuticos apropiados (37). Así, el análisis farmacocinético, basado en modelos matemáticos, del comportamiento de un antibiótico sirve para predecir regímenes de dosificación teóricos, que deberán ser verificados en subsiguientes estudios de las fases posteriores del desarrollo clínico (37).

1.2.3. Area de ensayos clínicos terapéuticos.

Si se consigue un reconocimiento académico de los ensayos clínicos como un difícil y necesario tipo de ciencia, se logrará un incremento en la calidad de los mismos.

Una evaluación objetiva del resultado del tratamiento antibiótico es frecuentemente más difícil que la evaluación de los efectos de otro fármaco.

Norby S R (1990). Clinical Trials of Antibiotics: Toward Improved Quality and International Standardization. The Antimicrobic Newsletter 7:57-63.

Las áreas anteriormente comentadas (microbiológica y farmacológica), correspondientes al desarrollo preterapéutico, nos aportan una serie de datos básicos en la definición de dos facetas: esquemas de dosificación para EC y elementos para el desarrollo y la interpretación de los TSA. Por ello, en esta fase terapéutica del desarrollo se comprobarán dos objetivos íntimamente unidos: la eficacia clínica del antimicrobiano con los intervalos de dosificación diseñados y la predicción de eficacia de los TSA teóricos (creados a partir de datos microbiológicos y farmacológicos), al evaluar los datos en EC. Estos EC prospectivos evaluarán la respuesta "in vivo" en el tratamiento de pacientes con tipos específicos de infección causadas por varias cepas de diferentes especies con CMI (o

diámetro de inhibición) conocida (15).

La base de datos para deducir una guía de interpretación de los TSA, y establecer los esquemas de dosificación, debe incluir los resultados de EC prospectivos y comparativos, preferiblemente doble ciego, del nuevo fármaco en comparación con terapéuticas establecidas estándar (15).

El problema básico radica en establecer una correlación entre datos fármaco-microbiológicos y datos de eficacia clínica, con el fin de comprobar los intervalos de dosificación y la eficacia predictiva de los "breakpoints" teóricos.

Cualquier falta de correlación entre la eficacia clínica y las categorías de susceptibilidad establecidas en el desarrollo de un fármaco se debería, según el problema definido en el párrafo anterior, a una falta de integración de los datos farmacológicos y microbiológicos (en la fase preclínica), o bien a una ausencia de precisión en la evaluación de la variable eficacia en los EC (en las fases II y III).

A pesar de la pregunta que establece O'Grady (38), a propósito del establecimiento de un potencial terapéutico a partir de un conglomerado de factores que englobara la actividad antimicrobiana y el comportamiento farmacocinético, y la respuesta parcialmente negativa que él mismo ofrece (39), la guía de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana del grupo de trabajo de la British Society of Antimicrobial Chemotherapy (1991) establece una sofisticada fórmula para el establecimiento de "breakpoints" que intenta tener en cuenta todos estos factores (25):

$$\text{"Breakpoint" CMI} = \frac{C_{\max} \cdot f}{t \cdot e} \cdot s$$

donde, C_{max} es el pico de concentración sanguínea de fármaco microbiológicamente activo, conseguido después de la fase inicial de distribución.

f es el factor que escenifica la unión a proteínas: 1 (<70%), 0.5 (70%-90%) y 0.2 (>90%).

t es el factor que escenifica $t_{1/2}$: 2 (<1 h.), 1 (1-3 h.) y 0.5 (>3 h.).

e es el número de veces que la C_{max} debe exceder la CMI.

El resultado de la operación con estos factores se redondea a la CMI más cercana en la serie de diluciones dobles que incluye 1 mg/l. El factor s escenifica el deslizamiento necesario para la reproductibilidad óptima de designación en relación con las distribuciones poblacionales con respecto a la CMI: 1 (ausencia de deslizamiento), >1 (deslizamiento del "breakpoint" hacia arriba) y <1 (deslizamiento del "breakpoint" hacia abajo). A veces es necesario sacrificar reproductibilidad del laboratorio en aras de la relevancia clínica.

El otro problema en la correlación fármaco-microbiológica con eficacia terapéutica es la ausencia de criterios más discriminatorios que las simples valoraciones de "curación", "mejoría" o "fracaso" en la evaluación de dicha eficacia terapéutica. Serían necesarias valoraciones más cuantitativas de los efectos antimicrobianos "in vivo" (tanto sobre el paciente como sobre el microorganismo), quizá utilizando un método de puntuación que estratificase el paciente, el lugar de infección, la severidad de la misma, el organismo infectante y el efecto sobre la flora habitual (26). Estableciendo métodos más cuantitativos de evaluación podríamos obtener, o definir, una mayor correlación entre la eficacia terapéutica y el factor numérico de susceptibilidad obtenido a partir de la relación entre factores microbiológicos y farmacocinéticos que anteriormente hemos comentado.

Los estudios fase IV, como monitorización de la eficacia clínica y microbiológica, son básicos en el campo de las enfermedades infecciosas, ya que como la susceptibilidad bacteriana varía frecuentemente con el tiempo, es necesario redefinir continuamente la interpretación de resultados (26) de los TSA. A la vista del número de pacientes que se deben reclutar en EC para demostrar diferencias significativas en los resultados, será extremadamente difícil demostrar la superioridad de nuevos regímenes terapéuticos a no ser que se tengan en cuenta factores básicos, como el aumento de resistencia a los actuales antimicrobianos, que entren en la ecuación clínica (40).

1.3. Predicción de eficacia.

Los microbiólogos normalmente prefieren concentrarse en obtener estimaciones reproducibles de la susceptibilidad antimicrobiana en el laboratorio, usando métodos estandarizados, y dejar el problema de la relevancia clínica al clínico que prescribe el antibiótico. El clínico, acostumbrado a pacientes infectados que responden a terapia inadecuada o dejan de responder a antibióticos a los que el organismo infectante es informado como totalmente susceptible, tiene poca confianza en los informes del laboratorio y basa su seguridad en la polifarmacia y en la sobreacción bactericida antimicrobiana.

D.Greenwood. 1981. In vitro veritas?. Antimicrobial susceptibility tests and their clinical relevance. J. Infect. Dis. 144:380-385.

Larga vida a la CMI,....

P.Silley. 1991. Susceptibility testing methods: why use the MIC. J. Antimicrob. Chemother. 28:144-145.

En la evaluación de nuevos antimicrobianos es tradicional la valoración de la actividad "in vitro" (debido a la característica de exogenicidad al organismo eucariote de la diana procariota de estos fármacos) e "in vivo" con modelos animales, antes de la administración a humanos (16).

La necesidad de los modelos animales se basa en la posible dicotomía de la actividad "in vitro" y la actividad "in vivo". Existe la posibilidad que un antibiótico sea clínicamente eficaz aunque no lo sea "in vitro" o en modelos animales (16). Así, 6

de cada 2000 nuevos compuestos cribados fracasaron en demostrar actividad "in vitro" cuando poseían actividad "in vivo" (41). En cualquier caso, y utilizando como parámetros la CMI y la DE₅₀ (41), la dicotomía "in vitro"/"in vivo" ocurre fundamentalmente con fármacos que demuestran actividad "in vitro" y no "in vivo" (39.6%), en vez del suceso contrario (actividad "in vivo" pero no "in vitro": 0.3%). Este hecho parece concordar con la práctica diaria, tras la comercialización del fármaco, donde el valor predictivo de las categorías del NCCLS (18)(19) de interpretación de susceptibilidad, es mucho más alto para la categoría resistencia (15).

Quizá la actividad "in vivo" (DE) podría ser más predecible de utilizar otros parámetros "in vitro" distintos a la CMI, u otros parámetros farmacocinéticos distintos a los niveles sistémicos, o bien diferentes relaciones farmacodinámicas entre ambos.

Distintos factores microbiológicos, farmacodinámicos y farmacocinéticos influyen sobre esta dicotomía en la actividad biológica "in vitro" (CMI) e "in vivo". Es necesario conocer el peso específico de cada uno de estos factores en la presencia o ausencia de capacidad de predicción de eficacia terapéutica con la finalidad de identificar distintas líneas de investigación que exploren cómo el éxito terapéutico puede ser más predecible.

Ya hemos comentado la mayor capacidad de predicción de la categoría resistencia sobre la variable eficacia, y la necesidad de modelos animales ya que los tests "in vitro" fracasan en predecir la actividad "in vivo" casi tan frecuentemente como aciertan (41). Cuando estudiamos interacciones de antibióticos (factor a estudiar según la guía para la investigación clínica de fármacos antibacterianos de la OMS (3)) las categorías de susceptibilidad, para la predicción de eficacia, reflejan la misma situación que cuando se trabaja con un solo fármaco. Así, a pesar de la equivalencia de distintos métodos en la demostración de actividad sinérgica de antibióticos (42), la

sinergia "in vitro" no asegura siempre éxito clínico, pero la ausencia de la misma se correlaciona frecuentemente con fracaso terapéutico (43). Este hecho es independiente del mecanismo de sinergia (inhibición secuencial o dual de la síntesis de la pared (44) (45), incorporación aumentada de los aminoglicósidos debido a los betalactámicos (43) o preservación de la actividad lítica de los betalactámicos (46) (47)) o de antagonismo (antibióticos bactericidas en combinación con bacteriostáticos (48) (49), o combinaciones de betalactámicos (50) mediante la hidrólisis del antibiótico antagonizado o la creación de una barrera entre el fármaco y su diana).

La menor capacidad de predicción de las categorías sensible (cuando se trabaja con un solo fármaco) o sinergismo (cuando se trabaja con varios fármacos) sobre la eficacia podría explicarse mediante la interrelación de una serie de factores que por sí solos ya tienen una determinada influencia: a. factores microbiológicos (como por ejemplo, tamaño del inóculo, virulencia del microorganismo, producción de betalactamasas (16)) y de generación bacteriana "in vivo" (41)(51); b. factores farmacocinéticos (52); c. factores farmacodinámicos (53)(54); y d. factores propios del huésped (edad, sexo e, incluso, cepa genética (55)).

1.3.1. Factores microbiológicos.

Vendrán compuestos en los próximos años, con los que está claro que si modificamos la situación del test en el laboratorio obtendremos mejor concordancia con modelos animales y respuesta clínica.

H C Neu, en la discusión subsiguiente a la presentación de la ponencia "Predicting Therapeutic Efficacy from in Vitro Tests: Unconventional in Vitro Tests" (D Greenwood). Dentro del Coloquio: Prediction and Assessment of Antibiotic Clinical Efficacy. The Medical Society of London. 26-28 de Septiembre de 1984.

Desde el enfoque microbiológico, inicialmente debemos plantearnos qué queremos saber de un test "in vitro" (56). Si lo que queremos averiguar es si un cultivo es lisado las pruebas a

realizar serán los tests turbidimétricos, que miden el efecto antibiótico sobre la biomasa, acompañados de microscopía. Si lo que queremos conocer es la pérdida de viabilidad de dicho cultivo, entonces mediremos las colonias viables en un test de actividad bactericida. Por último, si lo que queremos saber es si hay una proliferación del inóculo inicial, entonces llevaremos a cabo un test de CMI convencional.

Teniendo en cuenta las condiciones experimentales de realización de una CMI convencional, no es de extrañar que existan factores intrínsecos al TSA que influyan negativamente en la predicción de eficacia. En realidad muchas variables interaccionan con efectos marcados en el resultado del TSA (16). El número de microorganismos puede variar con el efecto del antibiótico sobre el tiempo de generación, la composición del medio con el anabolismo y catabolismo bacteriano, la temperatura y el pH con la actividad metabólica, y la concentración antibiótica con la degradación por enzimas bacterianas.

Por ello, parece importante estudiar las variables: tiempo de generación, efecto inóculo, enzimas inactivantes y composición del medio.

- Tiempo de generación

Con respecto al efecto del antibiótico sobre el tiempo de generación, está demostrado que el tiempo entre la adición del antibiótico y el comienzo de la lisis bacteriana es directamente proporcional a la tasa de crecimiento bacteriano previa a dicha adición (tasa rápida de crecimiento se correlaciona con intervalo corto de tiempo para la aparición de lisis)(57), siendo la tasa de formación de protoplastos también una función lineal del tiempo de generación (58). Es decir, a una concentración antibiótica determinada, el incremento del tiempo de generación bacteriana (previo a la adición del antibiótico) implica el incremento del tiempo necesario para producir una misma tasa de muerte bacteriana (59). La disminución inicial en las tasas de crecimiento bacteriano (tiempo de generación) por el antibiótico

podría influir de una forma dinámica sobre la tasa de muerte bacteriana por el antibiótico en etapas posteriores. Así, en modelos con dos antibióticos la inhibición del crecimiento bacteriano y división celular por agentes bacteriostáticos puede interferir en la acción bactericida de agentes activos exclusivamente sobre cultivos en crecimiento, como el antagonismo clásico entre tetraciclina y penicilina (60) o cloranfenicol y penicilina (48)(49)(61), debido únicamente al cese de crecimiento y división bacteriana por el agente bacteriostático, disminuyendo fenotípicamente la susceptibilidad bacteriana al agente bactericida (43). Cabe preguntarse, ante el hecho de que el cese completo de crecimiento implica tolerancia fenotípica a la acción de antibióticos bactericidas, si la disminución de la tasa de crecimiento también implicaría una disminución de la tasa de muerte bacteriana (59). Esta cuestión queda respondida por las funciones lineales anteriormente expresadas entre tasa de crecimiento bacteriano y tiempo de aparición del efecto lítico, o tasa de formación protoplástica.

El problema se complica con la falta absoluta de correlación entre los tiempos de generación bacteriana "in vitro" o "in vivo", así como en el tipo de crecimiento. En el tubo de ensayo las bacterias crecen más rápidamente que sus congéneres libres (62)(63); además éstas crecen en biopelículas (64) a diferencia del crecimiento en suspensión que ocurre "in vitro" (65). Este tipo de crecimiento en biopelículas, asociado con superficies animadas o inanimadas (66), conduce a unidades celulares recalcitrantes al tratamiento antibiótico (67) que sirven de foco de bacteriemias (68) y bacteriurias (69).

Por otra parte, la limitación de nutrientes que puede existir "in vivo" hace que la célula, además de expresar fenotipos particulares, limite su tasa de crecimiento de manera sensible con respecto al cultivo "in vitro" (64); así, la utilización de poblaciones celulares de alta densidad puede implicar una menor tasa de crecimiento. Como ejemplo de este hecho está el cese de crecimiento de los aerobios en la mayoría

de los medios enriquecidos, debido a la deprivación de oxígeno (64).

"In vivo", y en determinadas zonas topográficas del organismo animal, los nutrientes están limitados (59), demostrándose que, en nichos ecológicos naturales, las bacterias crecen más despacio debido a esta deplección (51). En estas condiciones, la mayoría de las bacterias responde con una respuesta coordinada de reducción de la tasa de síntesis macromolecular (70); este hecho se denomina respuesta estringente (71) gobernada por el "locus rel A" (59). La traducción de esta situación es la aparición de células metabólicamente inactivas, con una disminución de la tasa de crecimiento prácticamente inmediata después de la deprivación.

Desde el punto de vista de la antibioterapia se produce la ya comentada tolerancia fenotípica, debido a la relación expuesta entre tiempo de generación y lisis bacteriana o formación protoplástica. En estas condiciones los betalactámicos comunes no actúan, aunque determinados betalactámicos sean capaces de hacerlo al menos después de tiempos determinados de deprivación nutricional. Este tiempo se define como período de ventana (tiempo necesario de deprivación después del cual la adición de antibiótico a concentraciones de 10 CMI no puede causar un decremento ≥ 1 log en la viabilidad bacteriana a las 24 h.). El período de ventana es de 1/2 hora para la nocardicina y CMX y de 45 minutos para IMP (59). Es decir, existen betalactámicos activos (de forma bactericida, dependiendo de la concentración y del tiempo de deprivación del nutriente aminoácido) frente a bacterias metabólicamente inactivas o con tiempos amplios de generación o, lo que es lo mismo, cultivos con tasas bajas de crecimiento. Estos fármacos son activos al menos en las fases iniciales del desarrollo de la tolerancia fenotípica, hecho importante en infecciones que requieren la optimización de los efectos bactericidas (59).

- Efecto inóculo

Una vez comentada la acción de la deprivación de nutrientes sobre la tasa de crecimiento celular cabe pensar si poblaciones densas bacterianas son influenciadas de manera distinta que poblaciones en fase de crecimiento, por la presencia de antibiótico. Este hecho, de ocurrir, debe evaluarse en fármacos que actúen sobre las bacterias en fase de crecimiento.

Las poblaciones bacterianas existentes "in vivo" en determinados lugares de infección, son poblaciones de alta densidad bacteriana (p.e. abscesos). La manera inicial "in vitro" de estudiar este fenómeno sería establecer la presencia o no de efecto inóculo con respecto a la CMI (incremento del valor de la misma al incrementar el inóculo con que se realiza el TSA). Estudios previos (72)(73) sugieren que entre las múltiples variables que explican la actividad "in vivo", el efecto inóculo tiene un papel preponderante, contradiciendo la necesidad de superar en el pico sérico 4 a 10 veces la CMI (7)(74), y explicando por qué algunos antibióticos se dosifican para conseguir niveles en el pico sérico que excedan más de 500 veces la CMI (72).

Estudiar el efecto inóculo y la información que pedimos a los distintos TSA (actividad inhibitoria, actividad bactericida o actividad bacteriolítica) parece interesante, ante las posibles relaciones existentes entre la presencia o ausencia del efecto inóculo y la actividad bactericida y bacteriolítica, con el fin de verificar si estas variables, conjunta o aisladamente, predicen mejor la eficacia que el simple dato de actividad inhibitoria.

- Enzimas inactivantes

El efecto inóculo es de particular importancia en bacterias capaces de producir enzimas inactivantes, como las betalactamasas (16). Por una parte la concentración constante de antibiótico en el TSA puede decrecer debido a la degradación por parte de estas enzimas (16), pero más importante es si el TSA puede detectar el

efecto farmacodinámico "in vivo" debido a estas enzimas, el cual tendría relación con dos factores a estudiar en el desarrollo de un fármaco: inducción de las enzimas y resistencia a las mismas.

La inducción de betalactamasas "in vivo" ocurre relativamente despacio (4), pudiendo ser inespecífica (también son inductores moléculas bicíclicas como el ácido fólico, la hemina y la tiamina). Este tipo de inducción inespecífica es frecuentemente no detectable por los test "in vitro" de rutina pero presenta relevancia "in vivo" (75)(76). Este hecho tendría importancia en betalactámicos poco resistentes a la hidrólisis enzimática.

Con respecto a la inducción, el riesgo de crear el problema de difusión de resistencias es mayor en antibióticos que son débiles inductores y lábiles a la acción hidrolizante, ya que la selección de mutantes desreprimidas es mayor con inductores lábiles porque ponen a las mismas en situación ventajosa sobre el resto de la población celular (77).

Por todo ello, y desde el punto de vista de las pruebas "in vitro", es necesario estudiar la susceptibilidad del fármaco a la acción enzimática como defensa bacteriana, y la capacidad de inducción de dicha defensa por parte del mismo.

- Composición del medio

Hemos comentado variables físico-químicas que definen el TSA, tales como componentes capaces de inducción inespecífica, nutrientes y el efecto de la existencia o no de los mismos, variaciones en el pH debido al metabolismo (últimamente relacionado con los nutrientes), etc.

En el tubo de ensayo las bacterias son expuestas al antibiótico en un medio que sólo es parecido a las condiciones "in vivo" en que está muy suplementado con nutrientes derivados de fuentes biológicas (78). Aunque se buscan medios que parezcan más fisiológicos, no existe ninguno que simule las diversas

condiciones de infección o sea acorde a los distintos requerimientos nutricionales de todos los posibles patógenos. No obstante, se han realizado esfuerzos para normalizar el contenido de vitaminas, metales y electrolitos, intentando excluir las posibles sustancias antagónicas (79)(80), diseñándose medios que se han dado en llamar "completos" (81) con el fin de diferenciar la acción lítica del antibiótico al excluir la acción ambiental osmolar.

Del estudio de los factores microbiológicos en su influencia con la predicción de eficacia se abre camino la investigación de nuevas técnicas que obvien los distintos problemas que distancian este campo de la situación "in vivo", o bien, la búsqueda de nuevas relaciones (de las técnicas clásicas o de las nuevas buscadas) con parámetros farmacológicos que incrementen el nivel de predicción desde un punto de vista pragmático o profundicen en el conocimiento del grado de la misma desde el punto de vista explicativo.

1.3.2. Factores farmacocinéticos.

La farmacocinética representa un puente entre las fases "in vitro" e "in vivo" del desarrollo de un antibiótico.

Bergan T (1990). Requirements for the Documentation of Pharmacokinetic Properties of Antimicrobial Agents. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 9:506-509.

Un detallado análisis farmacocinético, matemáticamente basado, del comportamiento de un antibiótico sirve para predecir regímenes de dosificación adecuados.

Bergan T (1986). Requirements for Pharmacokinetic Evaluation of Antibiotics in Phase I Studies. Rev. Infect. Dis. 8 (Suppl 3):319-324.

El nivel de susceptibilidad a un antibiótico betalactámico

dependerá de su afinidad por las dianas (determinadas PBPs), el número de dianas no unidas a antibiótico necesarias para la función celular y la tasa de formación celular de nuevas dianas (82). La unión a las dianas dependerá de la concentración de antibiótico tras la barrera de difusión "membrana externa" (en el caso de las bacterias gram negativas). Prescindiendo del "trapping" como mecanismo de las betalactamasas contributivo a la resistencia en el caso de una membrana externa altamente impermeable al betalactámico (83), si la afinidad del mismo a la betalactamasa es menor que a la PBP, la enzima no incrementará significativamente el nivel de resistencia. Si ocurre el fenómeno contrario, la tasa de hidrólisis por cantidad de enzima es directamente proporcional a la concentración de sustrato (82). La concentración de este antibiótico (sustrato) depende de su influjo, a través de la membrana externa, y del incremento en el volumen de distribución bacteriano (variable si aumenta el tamaño celular, debido a la filamentación, tras la acción en determinadas PBP) para el antibiótico entrante. Este influjo a través de la membrana externa depende del área de dicha membrana, del gradiente de concentración a través de dicha barrera y del coeficiente de permeabilidad de la membrana para el fármaco en cuestión (83). Parece claro que el gradiente de concentración tiene como factor primordial la concentración antibiótica en el medio ambiente bacteriano.

Quizá debido a estos hechos, y hablando de una manera general, a mayores niveles tisulares mayor eficacia (6), lo que parece evidente en el caso de infecciones respiratorias y urinarias en humanos (33). Sin embargo, en el desarrollo posttoxicológico y preterapéutico de un fármaco, la determinación sistemática de niveles en varios tejidos humanos no es obligatoria ya que estos caros estudios tendrían limitaciones éticas y técnicas (6), no siendo posible titular la dosis con respecto a la respuesta clínica en humanos (33). No obstante, los modelos animales nos brindan una herramienta de investigación que provee conceptos básicos relevantes para el diseño de estudios preclínicos y clínicos (4).

La dependencia de la penetración tisular reside en tres factores: transporte activo, liposolubilidad y unión a proteínas (84).

El transporte activo es importante en la eliminación de algunos antibióticos, como la secreción tubular renal de muchos betalactámicos, y, en menor medida, en la penetración en líquido cefalorraquídeo (84).

En relación a la liposolubilidad, CRAIG y WELLING observaron, con datos de otros autores, una buena correlación (coeficiente de correlación: 0.986) con respecto al volumen de distribución del "antibiótico libre" (85).

La unión a proteínas es la asociación reversible de un fármaco con proteína (fundamentalmente albúmina) por enlaces iónicos (86), pudiendo ser afectada por la naturaleza de la proteína (animal o humana), por la concentración de la misma y por la concentración del fármaco. Desde el punto de vista de la antibioterapia, la unión a proteínas tiene implicaciones importantes, tanto para la actividad antimicrobiana del fármaco como para su farmacología (33).

La actividad de antibióticos con unión a proteínas no significativa es generalmente equivalente en suero y caldo (87) (88) (89). Sin embargo, hay un 25% de reducción en dicha actividad medida en suero, en comparación con caldo, en el caso de antibióticos con elevada unión a proteínas, como por ejemplo la cloxacilina con un 95%-96% (34). Sólo cuando la unión a proteínas excede aproximadamente el 90% existirá una reducción de 8 veces en la actividad microbiológica, en comparación con un agente que presente unión a proteínas no significativa (33).

Desde el punto de vista farmacológico la unión a proteínas influirá en la eliminación de un antibiótico en ausencia de secreción tubular renal significativa (33). En general, parece que los betalactámicos penetran rápidamente en tejidos no

especializados y que la subsiguiente tasa de eliminación depende del área de la superficie/volumen del compartimento (84). Así ocurre en fluido pleural (90), y en peritoneo (en ausencia de inflamación) donde se consiguen niveles del 70% al 80% de los séricos excepto para los antibióticos con elevada unión a proteínas (91). Parece, por tanto, que la única barrera para la penetración tisular (en ausencia de inflamación) es una alta unión a proteínas, superando el 80%, que produce una disminución en los niveles de fármaco total (libre y unido) (33) en el compartimento estudiado.

Intentando asociar los efectos de la unión a proteínas, farmacológicos y sobre la actividad antimicrobiana, con la variable eficacia, se recurre a los modelos animales. Utilizando S.aureus y penicilinas antiestafilocócicas, MERRIKIN et al. estudian dicha asociación (36). Sus resultados sugieren que a igualdad de otros factores la actividad terapéutica disminuye al incrementarse la unión a proteínas. Esta relación no es lineal y sólo cuando el nivel de antibiótico libre disminuye por debajo de aproximadamente un 10% la eficacia terapéutica (dosis prospectiva 50%) disminuirá considerablemente.

El siguiente paso es observar el efecto de la inflamación y/o infección sobre la penetración tisular, que es relativamente impredecible (6), ya que los fluidos inflamatorios suelen ser ultra-filtrados de los vasos, con menor pH y alta concentración de proteínas séricas. Para estudiar su influencia se recurre nuevamente a los modelos animales; así se observan (para seis betalactámicos estudiados) unos niveles del 13%-27% del sérico en abscesos estériles en ratones (92). Aunque fármacos lipoinsolubles penetran poco en los modelos de cajas tisulares o de fluido con envoltura de fibrina (93), no grandemente influenciados por la unión a proteínas como hemos visto, parece que se alcanzan niveles más altos en tejidos no infectados que infectados (94), quizá debido a la unión a proteínas inducida por la infección o al incremento de la pared de fibrina también inducido por la infección. Aproximadamente se obtiene el 25% del

pico sérico como pico en el fluido del modelo de caja tisular, por lo que parece lógico que las concentraciones séricas en el pico deban exceder 4 veces la CMI. Desde el punto de vista de la dosificación se consiguen mayores niveles tisulares en el modelo cuando los antibióticos son administrados en bolus en vez de infusión (95).

Aunque razones éticas impiden el uso de estos modelos en humanos, parece lógico aplicar la situación estudiada en estos modelos al diseño de estudios clínicos donde existan abscesos no drenados. El modelo de fluido vesicular se ha usado en humanos (94) permitiendo medir el porcentaje medio de penetración (y la influencia de dosis crecientes) en el exudado inflamatorio, pero hoy por hoy no hay correlación entre estos niveles intersticiales y la eficacia clínica.

Debido al escaso papel de la investigación sobre la penetración tisular en humanos, en la predicción de eficacia pre-EC, para la dosificación en los estudios Fase II y Fase III se utilizan datos cuidadosamente extrapolados de modelos animales (5) y una aproximación indirecta a partir de datos farmacocinéticos de estudios Fase I en humanos. Se trata de predecir los niveles extravasculares (y extracelulares, en su caso) a partir de datos séricos, teniendo en cuenta que factores farmacodinámicos (4) modificarán el sistema de predicción, e intentar equipararlos a eficacia (asumiendo de manera general la premisa de que a mayor nivel tisular mayor eficacia (6)). La relación nivel en el pico sérico/CMI es buen predictor para los aminoglicósidos (96), antibióticos cuya acción es dosis dependiente, mientras que el tiempo que la concentración sérica excede la CMI (4) lo es para los betalactámicos (antibióticos cuya actividad antibacteriana es tiempo dependiente), correlacionándose, en estos últimos, fracaso terapéutico con inadecuados niveles séricos en el valle para el fármaco libre (97).

1.3.3. Factores farmacodinámicos.

En base a la revisión de la literatura publicada se ha demostrado que los parámetros farmacocinéticos de los agentes antimicrobianos se correlacionan bien con la eficacia terapéutica en modelos animales, si los parámetros farmacodinámicos se tienen en cuenta.La correlación de los parámetros farmacocinéticos con eficacia terapéutica provee de importantes conceptos básicos para el diseño de estudios preclínicos y clínicos en el curso de los cuales se evidenciarán propiedades farmacodinámicas adicionales.

Dalhoff A and Ullmann U (1990). Correlation Between Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Efficacy of Antibacterial Agents in Animal Models. Eur. J. Clin. Microb. Infect. Dis. 9:479-487. Symposium on Antibiotic Policies (Organised by E.S.C.M.I.D, held in Viena, 25-27, March, 1990).

Diversos parámetros farmacodinámicos contribuyen a la eficacia "in vivo" de los antimicrobianos, por lo cual su estudio resulta adecuado en el desarrollo posttoxicológico y preterapéutico de un antibiótico, como parte sustancial de la predicción de eficacia pre-EC.

Estos factores farmacodinámicos se presentan en dos grandes grupos. El primero toma como diana del antibiótico el sistema inmune, y el segundo, toma como diana el fin último de los antibióticos: la bacteria.

Los antibióticos, a diferencia de otros fármacos, no están diseñados para actuar en la célula eucariótica. Desde un enfoque simplista se podría asumir que una acción de este tipo es un efecto adverso (98). Sin embargo, diversos estudios intentan dilucidar posibles efectos beneficiosos de los antibióticos en los mecanismos bactericidas séricos, función linfocítica y en varios aspectos de la actividad leucocitaria (quimiotaxis, fagocitosis y muerte intracelular) (78), como primera línea de defensa sistémica del organismo.

En relación con los componentes séricos, ya hemos comentado que la actividad de los antibióticos con unión a proteínas no significativa es equivalente en suero y caldo frente a bacilos gram negativos (87) (88) (89), sugiriéndose incluso que el efecto

inhibitorio del suero en la actividad de cefalosporinas de amplio espectro es menor que el predecible por el grado de unión a proteínas (99). Aparte de la unión proteica, dos factores pueden influir en el grado de acción combinada del antibiótico y suero humano sobre la bacteria: los propios componentes séricos y el mecanismo de acción del fármaco. Con respecto a aquéllos, se postula la posible existencia de un componente (o componentes) ultrafiltrable que aumente la actividad de las cefalosporinas de tercera generación frente a bacilos gram negativos (99). En relación a la propia acción del antibiótico, el efecto de éste (a concentraciones subinhibitorias) sobre la acción bactericida del suero se produce predominantemente en aquellos antibióticos con acción morfológica globular sobre la bacteria, en comparación con el mínimo efecto sobre los de acción morfológica de filamentación (100), siempre teniendo en cuenta la distinta susceptibilidad al suero de las distintas cepas bacterianas (101).

Concentraciones antibióticas bajas, que ocurren después de concentraciones terapéuticamente activas, pueden actuar sinérgicamente con los anticuerpos y pueden estimular la fagocitosis (102). Así, la penicilina sensibiliza a la bacteria a los efectos de los leucocitos polimorfonucleares e hidrolasas exógenas, como la lisozima (103); efectos que se pierden en bacterias en fase estacionaria tratadas con cloranfenicol, lo que sugiere que la tolerancia fenotípica es un fenómeno que se extiende también a un amplio rango de defensas del huésped (59).

Cuando estudiamos el antibiótico en relación con la diana para la que fue diseñado, la bacteria, diversos parámetros farmacodinámicos contribuyen a la eficacia "in vivo". Estos parámetros farmacodinámicos son el resultado de los efectos de las concentraciones supra-inhibitorias o sub-inhibitorias sobre la bacteria. Fundamentalmente, nos referiremos al PAE, tasa de muerte bacteriana y tipo de acción del fármaco (dosis o tiempo dependiente), interferencia con expresión génica y desintegración de las membranas bacterianas. Otros parámetros farmacodinámicos

importantes son los ya comentados (apartado 1.3.1.) de inducción "in vivo" de betalactamasas y estabilidad del antibiótico a las mismas.

Es muy difícil distinguir "in vivo" los efectos de concentraciones supra-inhedorias y concentraciones sub-inhedorias, en la eficacia antimicrobiana global (6), sin embargo, parece lógico pensar que no es necesario distinguir los efectos combinados de concentraciones supra y sub CMI ya que la acción conjunta es la que previene el recrecimiento bacteriano entre dosis (104).

Las concentraciones sub-inhedorias no sólo hacen a las bacterias más susceptibles a la función fagocítica (105) sino que además modifican la superficie celular (106), alterando la unión bacteriana a superficies epiteliales (102) (107), e interfieren la secreción de exoenzimas. Así, teóricamente, antibióticos capaces de inhibir la síntesis proteica podrían inhibir la producción de betalactamasas (43) (46). Con respecto a este último punto hay que tener en cuenta que las interacciones entre betalactámicos y cloranfenicol son complejas ya que, aunque bajas concentraciones de cloranfenicol pueden prevenir la producción de betalactamasa, altas concentraciones antagonizan el efecto de la penicilina (43). Aparte de estas acciones de las concentraciones sub-inhedorias sobre la expresión génica, las concentraciones sub-inhedorias también prolongan la fase post-antibiótica del efecto de concentraciones supra-inhedorias denominado PAE (104).

Los efectos farmacodinámicos más patentes de las concentraciones supra-inhedorias son el PAE, la disrupción de membranas bacterianas y la tasa de muerte bacteriana.

El resultado de la exposición previa al antibiótico define el fenómeno PAE (108), que ha sido descrito en una amplia variedad de microorganismos (109). Este parámetro farmacodinámico tendría que influir básicamente en la dosificación ya que

previene el recrecimiento de los microorganismos después de que las concentraciones de antibiótico caigan por debajo de la CMI. Así, los aminoglicósidos no tienen que ser mantenidos constatemente sobre la CMI para obtener la máxima eficacia (54), mientras que los betalactámicos sólo presentan PAE con pocas especies bacterianas, por lo que su relevancia "in vivo" no se puede generalizar y las concentraciones de estos antibióticos no deben caer por debajo de la CMI en el huésped infectado. A pesar de los estudios animales que demuestran la importancia del PAE como determinante en la óptima frecuencia de dosificación para distintos antibióticos, la aplicación al tratamiento de infecciones en humanos ha sido lenta (108).

Diversos antibióticos actúan, aparte de sobre sus dianas bacterianas habituales, sobre las membranas bacterianas a concentraciones supra CMI, pudiendo tener importancia fisiológica en bacterias en fase estacionaria de crecimiento (4). Debido a que esta acción se ejerce a concentraciones supra CMI, no es detectada en los TSA rutinarios de laboratorio. Aunque el efecto de los aminoglicósidos sobre las membranas bacterianas y el de la ciprofloxacina sobre la membrana citoplasmática no tienen importancia fisiológica, ya que se consiguen a concentraciones superiores a las fisiológicas, el efecto de esta quinolona sobre la membrana externa sí se ejerce a las concentraciones conseguidas tras dosificaciones habituales. Así, en un estudio cruzado en voluntarios sanos, este último antibiótico consigue mayor actividad bactericida sérica que la norfloxacina, a pesar de menores niveles séricos de ciprofloxacina en comparación con norfloxacina (110). A concentraciones similares a las conseguidas en el pico sérico la ciprofloxacina es rápidamente bactericida (111) y ejerce un efecto sobre la integridad de la membrana externa bacteriana (112); estos hechos sugieren una propiedad farmacodinámica adicional que contribuye a la eficacia antibacteriana (4).

El test "ex vivo" de actividad bactericida sérica puede proveer de una medida más significativa de la utilidad potencial

de agentes antimicrobianos (113) (114) (115), ya que, como hemos visto, toma en consideración la actividad "in vitro", la farmacocinética del fármaco y la farmacodinamia del mismo (116); mide el efecto combinado de la absorción y eliminación del agente antimicrobiano, su potencial unión a proteínas séricas y el efecto de congéneres metabólicos del compuesto original sobre el microorganismo (117). Diversos estudios indican que títulos bactericidas superiores a 8 se correlacionan con tasas de eficacia significativamente mayores que las correspondientes a títulos inferiores (43), demostrando su utilidad en la monitorización de la terapia antibacteriana de endocarditis, bacteriemia en pacientes oncológicos, osteomielitis, artritis séptica, meningitis (117) y sepsis por gram negativos (118).

Por último, y con respecto a la tasa de muerte bacteriana (medición de supervivencia celular -representación semilogarítmica del recuento de ufc/ml habitualmente a las 0, 4, 12 y 24 horas- tras exposición a una concentración antimicrobiana, la cual suele escogerse según el pico sérico conseguido con la terapia) cabe distinguir dos tipos de acción antibiótica. Así, mientras los aminoglicósidos demuestran una acción bactericida concentración dependiente (un incremento de concentración antibiótica se corresponde con un aumento de la magnitud de tasa de muerte bacteriana), los betalactámicos tienen una acción bactericida con muy escasa dependencia de la concentración antibiótica (117) supra-inhibitoria (4).

De esta forma, con los aminoglicósidos una administración en "bolus", generando altas concentraciones en el pico sérico (119), es más efectiva que dosis fraccionadas que resultarían en bajas concentraciones en el pico, pero un tiempo de concentración antibiótica sobre la CMI prolongado (t/CMI). En contraposición, múltiples dosis o infusión constante de betalactámicos que generen altos t/CMI resultan en un control significativamente mejor de las infecciones experimentales, que administraciones antibióticas menos frecuentes que generen altos picos séricos con bajos t/CMI (120). Como conclusión, estudios animales que toman

en cuenta dos parámetros farmacodinámicos (PAE y la acción bactericida concentración dependiente, o t/CMI dependiente) dan lugar a una correlación significativa de parámetros farmacocinéticos y eficacia terapéutica con antibióticos betalactámicos y aminoglicósidos (54).

Todos los factores farmacodinámicos comentados deben ser aplicados cuidadosamente en la correlación de parámetros farmacocinéticos y eficacia terapéutica, ya que parámetros farmacodinámicos específicos de antibióticos individualizados pueden contribuir sustancialmente a la eficacia "in vivo", mientras que antibióticos del mismo grupo de fármacos antimicrobianos pueden carecer de estos atributos farmacodinámicos adicionales (4).

1.3.4. Factores propios del huésped.

El efecto de un antibiótico per se es con frecuencia difícil de evaluar.

Norrby S R (1990). Clinical Trials of Antibiotics: Toward Improved Quality and International Standardization. *The Antimicrob. Newsl.* 7:57-63.

En la predicción de eficacia pre-EC intervienen los datos microbiológicos, farmacocinéticos y farmacodinámicos obtenidos en la fase postoxicológica y preterapéutica del desarrollo de antimicrobianos. Los EC de la fase terapéutica del desarrollo entrarán en la base de datos, para concluir la guía de interpretación de los TSA (15). Por ello, alteraciones en la predicción de eficacia podrían deberse a una falta de integración de datos farmacológicos y microbiológicos de la fase pre-clínica o bien a una ausencia de precisión en la evaluación de la variable eficacia, en la fase clínica.

Normalmente los fármacos están diseñados para actuar sobre la célula eucariótica, sobre una diana específica, y en un determinado espacio corporal. Por contra, los antibióticos están diseñados para actuar sobre la célula procariótica, tienen más de una diana de acción (distintas especies bacterianas con

distintas propiedades biológicas) y deben combatir infecciones en distintos espacios corporales con distintas propiedades cinéticas.

Dos factores dificultan aún más la evaluación del efecto de un antibiótico. Muchas veces las infecciones bacterianas son complicaciones de otras enfermedades y, por otra parte, existen tasas espontáneas de curaciones de estas infecciones.

La característica de exogenicidad patogénica de las enfermedades infecciosas hace que la eficacia antibiótica se suela medir con variables dicotómicas: curación o ausencia de la misma, y erradicación bacteriana o persistencia. Como consecuencia de este hecho, un gran número de pacientes es requerido en la estimación de muestra de EC comparativos (98), muchos más que si dispusiéramos de variables primarias de eficacia continuas o semi-continuas.

Por todo ello, se requiere una valoración más cuantitativa de los efectos "in vivo" de los antimicrobianos (quizá usando métodos de evaluación que consideren el tipo específico de paciente, el lugar y gravedad de la infección, el o los organismos infectantes y el efecto sobre la flora normal) para evaluar la capacidad de predicción de eficacia de los TSA (26), redefiniendo continuamente la interpretación de los resultados, a la vista de la susceptibilidad antimicrobiana cambiante a lo largo del tiempo, mediante estudios fase IV apropiados (26).

Así, como indica Baquero (26), una estandarización precisa de los TSA, firmemente unida a una estandarización de la medición del impacto antibiótico en pacientes y microbios, convertirá la precisión en verdad.

2. CEFMINOX.

2.1. Información sobre el mecanismo de acción.

Hemos visto que diversos antibióticos además de actuar sobre sus dianas bacterianas habituales, ejercen una acción sobre las membranas bacterianas, a concentraciones supra o peri CMI, pudiendo tener importancia fisiológica en bacterias en fase estacionaria de crecimiento (4).

Por otra parte, los betalactámicos que lisan bacterias que no están en fase de crecimiento necesitan la integridad del anillo betalactámico (59), ejerciendo su acción por una senda operativa similar a la que utilizan para actuar sobre bacterias en fase de crecimiento, ya que incluso en las bacterias en fase estacionaria persiste una cierta tasa de síntesis de pared (121). Es probable que la PBP que cataliza esta pared para este estado bacteriano sea la 7 en E.coli, ya que parece existir una buena correlación entre la afinidad de los betalactámicos a esta PBP y su capacidad para lisar E.coli en fase estacionaria (28) (122). El conocimiento de estas enzimas, así como el de la estructura de la pared que catalizan, es clave para entender la base de la lisis de las bacterias en fase estacionaria. Quizá la pared catalizada muestre alteraciones en los lugares de unión de la autolisina o presente inhibidores de la misma (121), y tras largos períodos de síntesis y acumulación de pared alterada en este estado bacteriano, incluso antibióticos con amplios períodos ventana pierdan su actividad (123). En cualquier caso parece que los betalactámicos que mantienen actividad frente a E.coli en estado estacionario no presentan el mismo perfil de afinidad por las PBP que los antibióticos que causan lisis bacteriana únicamente en fase logarítmica (59) (124).

CMX es una cefamicina con características estructurales que lo apartan de otros miembros del grupo.

La presencia de D-cysteina en posición 7 beta parece

responsable de la actividad de la molécula frente a una nueva diana lítica. Además de actuar sobre las dianas características de los betalactámicos del mismo grupo (PBPs 1a/1b, 3), esta molécula se une al peptidoglicano con el residuo D-cisteína e inhibe su unión a la lipoproteína de la membrana externa. Este segundo efecto de la molécula lleva a una inducción de lisis bacteriana rápida. Ha sido demostrado que la N-acetylación de la porción D-aminoácido, o su conversión a L-aminoácido, causa un decremento de la actividad del fármaco (125). Ante la misma permeabilidad celular, estabilidad frente a betalactamasas y afinidad por las PBPs (del E.coli), tanto de CMX como su pariente L-amino, la diferencia de actividad antibacteriana entre ambos betalactámicos es atribuible a la función D-amino de CMX. Así, su potente actividad lítica es inhibida por ciertos D-aminoácidos pero no por L-aminoácidos (126).

2.2. Información previa del fármaco.

2.2.1. Aspectos microbiológicos.

CMX presenta una actividad inhibitoria frente a aislamientos (anteriores a 1985) menor o igual a los fármacos utilizados como control (127) en el desarrollo previo realizado en Japón. Destaca su gran actividad frente a B.fragilis (128).

Sin embargo, su particular modo de acción hace que tenga una serie de características diferenciales con respecto a distintos parámetros microbiológicos:

a. Actividad bactericida. En términos de CMB, tras 6 o 24 horas de exposición, el CMX fue más activo que cefalosporinas de 2ª y 3ª generación frente a enterobacteriaceas pertenecientes a los géneros Escherichia, Klebsiella, Proteus y Serratia, a pesar de las diferencias en términos de CMI (127).

b. Efecto de concentraciones antibióticas decrecientes en la actividad bactericida. En estos estudios (129) utilizando un

aparato de extracción antibiótica (130), es posible simular $t_{1/2}$ de los fármacos en roedores. CMX demostró mantener su actividad antimicrobiana, mientras las cefamicinas control presentaban un menor decremento del contage de ufc/ml, proporcional al decremento de la concentración antibiótica. CMX presentó una acción lítica más precoz, mayor y sin filamentación celular, en contraste con los fármacos control (129).

c. Modelos de crecimiento bacteriano lento. Dos experimentos fueron llevados a cabo para ver la actividad de cefamicinas frente a bacterias en esta situación. El primero (131) utiliza inóculos densos y el segundo (132) introduce factores limitantes en el medio de cultivo, utilizando equipo sofisticado (Chemostat) como parte avanzada del cribaje de actividad antibacteriana (28) en situaciones especiales. CMX, a diferencia de los fármacos control, mantiene su actividad lítica frente a las cepas utilizadas (E.coli, Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescens y Salmonella enteritidis), después de añadirse al medio de cultivo, siendo lisadas las células a concentraciones menores y, a veces, sub-inhedorias.

2.2.2. Farmacología experimental.

Prescindiendo de los aspectos toxicológicos, que no son objetivo de esta tesis, han sido realizados varios modelos animales de eficacia. Se constata la eficacia preventiva de infección del fármaco en comparación con otras seis cefalosporinas (128). En un estudio (131), a pesar de las diferencias en los valores de la CMI de CTX y CMX (a favor de la primera), no se encontró diferencia en la distribución de la DE_{50} frente a 17 bacterias. En este mismo estudio, y frente a gram negativos (excluyendo Proteus), la distribución de los rangos de DE_{50}/CMI para CMX era significativamente menor que para CTX o cefoperazona, siendo las DE_{50} para CMX menores que las esperadas por sus CMIs.

Dos estudios sugieren que las propiedades farmacocinéticas

del CMX no juegan un papel fundamental en su actividad in vivo, en comparación con otros fármacos. En el primero (127), se postula mayor actividad in vivo del CMX (DE₅₀ en ratones Slc:ddY) frente a cefalosporinas de 2ª y 3ª generación (a pesar de la diferente actividad en términos CMI), siendo similares las AUC y los niveles séricos de los fármacos estudiados. En el segundo (132), se presenta una mayor actividad in vivo comparativa con cefmetazol, presentando el fármaco problema niveles séricos, peritoneales y tisulares menores que el fármaco control en un modelo animal similar al anterior, de sepsis por gram negativos.

2.2.3. Farmacología humana.

Hasta la actualidad no se ha realizado ningún estudio Fase I en caucasianos. Los resultados de tres estudios Fase I han sido presentados en orientales (133) (134) (135) en congresos internacionales. El primero de ellos en 12 voluntarios con dosis de 1 g., y controlado con CFX, cefmetazol y cefbuperazona (a las mismas dosis), determinándose los niveles séricos por HPLC y método biológico (*Vibrio percolans* para CMX). El CMX presentó los siguientes valores medios farmacocinéticos: nivel en el pico 127 mcg/ml, $t_{1/2}$ de 2.28 horas y AUC de 296 mcg/h/ml y unos niveles urinarios de aproximadamente 9000 mcg/ml tras una hora de su administración, recuperándose tasas del 65% a las 6-8 horas después de la infusión. En estos estudios japoneses no se detectan metabolitos activos en orina humana (134).

En el tercer estudio (135) se midió la unión a proteínas a partir de voluntarios sanos, que presentó valores promedio del 68%, con independencia de la concentración en el rango terapéutico usual (< 100 mcg/ml).

II. OBJETIVOS

El fin último del desarrollo posttoxicológico y preterapéutico de un antimicrobiano es obtener datos, tanto de las áreas microbiológica, farmacológica experimental y farmacológica clínica (Fase I), para diseñar futuros EC, donde demostrar la eficacia y seguridad del fármaco en pacientes. A partir de los datos de la fase posttoxicológica y preterapéutica del desarrollo del fármaco obtendremos las bases farmacobiológicas de elección de la patología donde realizar dichos EC, y los datos para la deducción de la dosificación en cada EC en particular. Los fármacos comparativos de estos futuros EC deben adaptarse al estándar comunitario para el proceso infeccioso o microorganismo objeto del estudio, requiriendo la FDA que el fármaco elegido como control (y su régimen de dosificación) para la infección estudiada sea el aprobado por esta agencia de regulación (136). Por ello, parece lógico que todos los estudios comparativos integrantes del desarrollo posttoxicológico y preterapéutico utilicen fármacos similares a los del estándar comunitario aplicado en el abanico de patologías, de entre las cuales se elegirán los futuros EC dependiendo de los resultados de esta fase del desarrollo.

Desde el punto de vista microbiológico, y con independencia de que la determinación de la actividad antimicrobiana de un fármaco se formule por el principio de Wold (incluir el máximo número de pruebas para obtener el máximo número de datos) (27), las recomendaciones de la OMS incluyen la actividad frente a cepas estándar, aislados clínicos recientes, actividad comparativa con fármacos del mismo grupo, resistencias e interacciones con otros antimicrobianos (3). Además, en el caso de los betalactámicos debe estudiarse el efecto inóculo y otras pruebas menos convencionales (28).

Desde el punto de vista de la farmacología experimental, la correlación de los parámetros farmacocinéticos con la eficacia terapéutica provee de importantes conceptos básicos para el diseño de estudios preclínicos y clínicos en el curso de los cuales se evidenciarán propiedades farmacodinámicas adicionales

(4). En la evaluación de un nuevo fármaco en modelos animales discriminativos, para minimizar errores en la siempre arriesgada extrapolación de resultados a la patología humana, es necesario incluir comparaciones con regímenes de tratamientos convencionales y efectivos (16). Este criterio de control (estudios comparativos) es básico, ya que parámetros farmacodinámicos específicos de fármacos individualizados pueden contribuir a la eficacia "in vivo", mientras que antibióticos del mismo grupo pueden carecer de estos parámetros adicionales (4). En resumen, estos modelos discriminativos permiten obtener datos de las relaciones entre los niveles y eficacia, y el valor predictivo de las propiedades cinéticas o "in vitro" del fármaco, permitiendo una aproximación terapéutica y ayudando al diseño de EC, siendo útiles en la definición de la dosis óptima (5).

Desde el punto de vista de la farmacología clínica, resulta conveniente realizar un Fase I en caucasianos ante la ausencia de estudios de este tipo en esta población.

Tres son los objetivos generales de esta tesis:

1. Como objetivo primario, investigaremos la predicción de actividad biológica, del antibiótico problema comparativamente con fármacos control, en sus tres facetas:

a. "in vitro".- Actividad farmacodinámica a partir de datos microbiológicos estándar.

b. "in vivo".- Actividad terapéutica en modelos animales a partir de datos "in vitro".

c. "ex vivo".- Actividad farmacodinámica en voluntarios sanos a partir de datos farmacocinéticos y/o "in vitro".

2. Como objetivo secundario describiremos cómo se completó, de acuerdo con las normativas y recomendaciones de las distintas agencias de regulación y sociedades científicas, el desarrollo postoxicológico y preterapéutico del antibiótico problema, evaluando el grado de adhesión a las últimas recomendaciones

publicadas. Para ello, describiremos los estudios llevados a cabo exclusivamente en nuestro país (al no haber sido incluidos en la etapa del desarrollo preterapéutico realizada previamente en Japón), utilizando los fármacos de nuestro estándar comunitario, y examinando el cumplimiento de todos los requerimientos de las recomendaciones vigentes (sobre la información exigida de un antibiótico antes de su administración a pacientes).

3. Como objetivo pragmático obtendremos, de la interrelación de los distintos estudios y tras la discusión de los objetivos anteriores, las bases fármaco-biológicas para la elección de la patología, y la deducción de la dosificación para los futuros EC de la fase clínica del desarrollo del fármaco.

III. MATERIAL Y METODOS

1. CENTROS, INVESTIGADORES Y ESTUDIOS QUE INTEGRAN EL PROGRAMA.

Para el desarrollo posttoxicológico y pre-terapéutico de CMX se contactaron 7 centros (varios de ellos trabajaron conjuntamente y la mayoría de los mismos llevaron más de un estudio). Cuatro de ellos realizaron los estudios microbiológicos, 1 el modelo animal (farmacología experimental), 3 participaron en la ejecución del Fase I en sus distintas facetas, mientras que 1 se encargó de la gerencia, coordinación y diseño de los EC a partir de los datos (y su interrelación) de esta fase.

La condición de investigador se definió a partir del hecho de ser firmante o autor de 1 ó más de los siguientes documentos: protocolo, contrato con el promotor, informe final y/o publicación (o presentación de posters o comunicaciones orales en congresos) generada, y cumplir los requerimientos de autoría para revistas biomédicas (BMJ 1991; 302:338-341).

Participaron 17 investigadores en el desarrollo del programa, durante los años 1989, 1990 y 1991. En las tablas 1 y 2 quedan reseñados los centros, investigadores y estudios, así como las citas bibliográficas a que han dado lugar hasta el momento. La tabla 1 corresponde a los estudios microbiológicos, mientras que en la tabla 2 se reseñan los estudios realizados en voluntarios sanos.

2. ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS EN EL PROGRAMA.

En la tabla 3 se reseñan los antibióticos utilizados en el desarrollo preterapéutico de CMX. Se utilizaron 15 antibióticos en el conjunto de todos los estudios, de los cuales más de la mitad corresponden, lógicamente, al grupo de las cefalosporinas. Como antibiótico control fundamental se utilizó la cefamicina CFX en los estudios comparativos, es decir, estudios números 1 al 10.

3. CEPAS UTILIZADAS.

Las cepas tipo utilizadas en los distintos estudios quedan reseñadas en la tabla 4.

En el estudio número 1 de susceptibilidad (actividad inhibitoria) se utilizaron aislados clínicos del Hospital Ramón y Cajal de Madrid (137). Estos fueron 885 cepas obtenidas de hemocultivos realizados entre 1987-1989 (un aislamiento por paciente), 47 cepas de Haemophilus influenzae, y 16 cepas del grupo Bacteroides fragilis procedentes de otras muestras clínicas.

Otros aislados hospitalarios (50 cepas de Bacteroides grupo fragilis) y enterobacteriaceas (E. coli, Klebsiella spp, Proteus rettgeri, Enterobacter spp y Citrobacter freundii) fueron utilizados en los estudios "actividad frente a Bacteroides fragilis" (número 10) e interacción "in vitro" con otros antibióticos" (número 13), respectivamente.

Las cepas con betalactamasas tradicionales y de amplio espectro utilizadas en el estudio número 2 (137) fueron amablemente suministradas por A. A. Medeiros (Providence R.I.) a J. Martínez Beltrán (H. Ramón y Cajal, Madrid). Además en este estudio se utilizaron distintos aislados clínicos (5 E. coli, 1 Salmonella arizonae, 1 Klebsiella oxitoca y 1 Enterobacter cloacae) productores de distintas betalactamasas (TEM, SHV y Clases IV, Ib y Ia).

Para estudiar el efecto de la mutación $OmpF^-$ en el nivel de resistencia a antibióticos betalactámicos (estudio número 3) (137), los plásmidos que codificaban estas betalactamasas tradicionales y de amplio espectro fueron introducidos en el E. coli 4100 $OmpF^+$ y E. coli MH 621 $OmpF^-$.

Distintas cepas patrón ATCC se utilizaron en los estudios microbiológicos números 4, 5, 7, 8, 11 y 12, en el modelo animal

(estudio número 9) y en el estudio "ex vivo" del EC Fase I (estudio número 15).

Para la medición de niveles por bioensayo fueron utilizados el Bacillus subtilis ATCC 6633 en el EC Fase I, y el Vibrio percolans ATCC 8461, E. coli NTCC 10418 y Sarcina lutea NTCC 9341 en el modelo animal discriminativo (estudio número 9) (73), dependiendo del antibiótico a analizar.

En los estudios de actividad bacteriolítica (número 4) y efecto inóculo (número 5), se utilizó, además de las cepas ATCC reseñadas, un aislado de E. coli reciente, procedente de una muestra de orina (E. coli S-31) del Departamento de Microbiología del Queen's Medical Centre (Nottingham). Esta última cepa, junto el E. coli ATCC 25922, se utilizó en el estudio de consumo de CMX, comparativamente con distintos betalactámicos, por cepas susceptibles de E. coli (número 6).

Cuatro aislados clínicos de Bacteroides fragilis del Public Health Laboratory (Nottingham), así como otras 4 cepas (2 B. fragilis, 1 B. distasonis y 1 B. thetaiotaomicron) cedidas a este centro (140) fueron utilizadas en el estudio de susceptibilidad de CMX, comparativamente con CFX, a las betalactamasas del Bacteroides spp (número 6).

Por último, para el estudio de inmunomodulación (número 16), dentro del EC Fase I se utilizó una cepa de Candida albicans.

4. MÉTODOS UTILIZADOS.

En la tabla 5 se presentan los métodos "in vitro" utilizados, así como las citas bibliográficas donde se reseñan detalladamente. En la tabla 6 se muestran los métodos "in vivo" y "ex vivo", las citas bibliográficas donde se describen, así como los métodos utilizados para determinación de niveles de antibiótico ya sea "in vitro" (consumo de CMX -estudio número 12-

y susceptibilidad comparativa de CMX a betalactamasa de Bacteroides spp o cepas susceptibles de E.coli -estudio número 6-), o "in vivo" (modelo animal discriminativo -estudio número 9- o voluntarios sanos -estudios números 14 y 15-).

En la tabla 7 se describen los medios microbiológicos usados para llevar a cabo dichos métodos.

4.1. Estudios microbiológicos.

En los estudios números 1 al 3 se utilizó un inóculo de 10^4 ufc/ml, utilizando replicador de Steers en su caso. Para la determinación de susceptibilidad de Streptococcus viridans y S.pneumoniae se utilizó el método de microdilución.

Para la determinación de la actividad bacteriolítica (estudio número 4) se utilizó un equipo turbidimétrico computerizado de seis canales (151). Se definieron como las distintas concentraciones líticas aquéllas que producían los distintos porcentajes de decremento turbidimétricos cuando el antibiótico era añadido a un inóculo bacteriano alto (aproximadamente 5×10^8 ufc/ml) en medio "completo" (30% de opacidad). Se define CMA a la concentración mínima de antibiótico que tiene un efecto antibacteriano en el anterior ensayo descrito. La CMI turbidimétrica es definida como la menor concentración de antibiótico que inhibe un aumento de densidad óptica, cuando el antibiótico se añade a tiempo 0 a un inóculo de aproximadamente 10^6 ufc /ml.

Para la determinación del efecto inóculo (estudio número 5) se determinó la CMI por macrodilución en caldo a dos inóculos (5×10^5 y 10^8 ufc/ml), utilizando tanto Mueller-Hinton, como caldo completo.

Los extractos crudos de betalactamasa para el estudio número 6 (susceptibilidad de CMX a betalactamasa de Bacteroides fragilis) fueron obtenidos por ultrasonificación de suspensiones

bacterianas (152) y concentradas cinco veces usando membranas Amicom (Amicon Ltd. Stonehouse, Glos.). La posible caída de antibiótico fue medida por HPLC en una mezcla conteniendo 0.8 ml de solución antibiótica (6.5 mg/l) y 0.2 ml de extracto enzimático crudo, para alcanzar una concentración final de 50 mg/l (140). También se obtuvieron por ultrasonificación los extractos crudos de betalactamasas de las cepas de E.coli ATCC 25922 y E.coli S31 para estudiar la caída en la concentración de betalactámicos por las betalactamasas de estas cepas (141), al incubar (37°C) en proporción 1/1 soluciones acuosas (100 mcg/ml) de los antibióticos (AMP, AZT, CFU, CFZ, CMX e IMP) con dichos extractos.

Para estudiar la actividad bactericida en los experimentos realizados con inóculo alto en el estudio de actividad bacteriolítica (número 4), se tomaron alícuotas en los tiempos 0, 2, 5 y 20 horas postexposición al antibiótico para el recuento de colonias usando el método "Spiral System"; asimismo para la observación de cambios morfológicos microscópicos por microscopía de interferencia de contraste (138) se tomaron alícuotas tras 1 h. postexposición.

También para la determinación de la actividad bactericida y el efecto sobre la misma del suero humano (estudio número 8) se construyeron curvas de muerte bacteriana en los medios de cultivo (con y sin 10% de suero humano inactivado por calor: 55 °C/30 min.) conteniendo 8, 4 y 2 mcg/ml, dando pases para recuento a las 0, 6 y 24 horas. Los experimentos fueron realizados por cuadruplicado a partir de un inóculo inicial de 5×10^6 ufc/ml. de E.coli ATCC 25922 y B.fragilis ATCC 25285 (142).

Para estudiar la velocidad de actividad bactericida se comparó la pendiente de la tangente a la curva de muerte bacteriana construida entre las 0 y las 3 horas, en experimentos realizados en caldo Mueller-Hinton con dos tamaños de inóculo (10^5 y 5×10^7 ufc/ml), a concentraciones de 4 veces la CMI de CTZ, CTX, CFX y CMX, y midiendo la viabilidad bacteriana a las

1.5, 3, 6 y 24 horas (142b). También estos experimentos fueron realizados por cuadruplicado.

La actividad frente a Bacteroides grupo fragilis (estudio número 10) se determinó utilizando un inóculo de 10^5 ufc/ml aproximadamente.

Para la cuantificación del efecto postantibiótico (estudio número 11) se utilizaron cultivos bacterianos de 10^7 ufc/ml en fase logarítmica de crecimiento, y se expusieron durante 1 hora a diferentes concentraciones (CMI y 10 CMI) en agitación a 37 °C. En el agente antimicrobiano se eliminó por dilución (158). Los recuentos bacterianos se realizaron cada hora, cuantificándose el PAE como la diferencia de tiempo entre cultivos problema y controles para aumentar ambas poblaciones un logaritmo tras la eliminación del antibiótico.

Para la cuantificación del consumo de CMX (estudio número 12) se incubaron en agitación a 37°C los cultivos con 10^7 ufc/ml, a los que se añadía hasta concentraciones de 20 CMI de CMX para E.coli ATCC 25922 y 10 CMI para B.fragilis ATCC 25285 y el cultivo mixto, extrayéndose durante 6 horas, cada hora, alícuotas de 5 ml. Tras centrifugarse (2000 rpm/15 min.) se cargaron 3 discos (Bacto concentration disk 1/2. Difco) a partir del sobrenadante, y se enfrentaron por el método de difusión en agar a E.coli ATCC 25922. Tras incubación de 10 a 20 horas se midieron los halos de inhibición, que se interpolaron a una recta estándar previamente construida para calcular las correspondiente concentraciones. Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado.

En el estudio número 13 (interacciones "in vitro" con otros antimicrobianos) las pruebas se realizaron en medio sólido por diluciones a partir de una solución madre (256 mg/ml) de cada antibiótico, con intervalos de concentraciones entre 0.06 y 128 mg/ml. Se utilizó un inóculo de 10^5 ufc de las distintas cepas, el cual se inoculó con un replicador de Steers, estableciendo la

concentración mínima inhibitoria para cada antibiótico (en combinación) como la correspondiente a la placa con menor concentración de dicho antibiótico y sin crecimiento visible. La concentración fraccionaria inhibitoria fue obtenida por el cociente de la CMI en combinación dividida por la CMI de cada antibiótico aisladamente.

4.2. Modelo animal.

Para el modelo animal discriminativo (estudio número 9) se utilizaron métodos descritos previamente (72) (159). Ratas Wistar (180-200 gr.) fueron inoculadas intraperitonealmente con 2×10^8 ufc de E.coli ATCC 25922 en 5% de mucina gástrica porcina. Los antibióticos a diferentes dosis se inyectaron intramuscularmente 30 min. y 5 horas después de la inoculación microbiana. La mortalidad de las mismas se evaluó a las 24 y 48 horas. Los niveles de antibiótico se determinaron 5, 15, 30 y 60 min. después de la primera dosis (73). Los experimentos fueron realizados secuencialmente usando grupos de 40 ratas simultáneamente, 20 tratadas y 20 control.

4.3. Ensayo Clínico Fase I.

4.3.1. Farmacocinética (estudio número 14) y farmacodinamia (estudio número 15).

- Diseño del estudio en voluntarios.

Se randomizaron seis voluntarios sanos en este estudio Fase I cruzado y simple-ciego. Tenían las siguientes características (media \pm SD): edad, 20 ± 1 años; altura, 181 ± 10 cms.; peso, 69.6 ± 10.9 kg. Todos ellos presentaban datos dentro de la normalidad en la historia clínica, exploración física, análisis de orina, bioquímica sérica, ionograma, recuento de células sanguíneas y plaquetas y electrocardiograma (ECG).

El CMX fue administrado intravenosamente (en dosis únicas de 1 y 2 gr.) después de un desayuno habitual entre las 9 y las

10 a.m. Se respetó un intervalo de una semana como período de lavado en cada una de las fases del estudio para cada uno de los sujetos. Los voluntarios ingresaron en la Unidad de Farmacología Clínica durante 24 horas en los dos días de estudio, durante los que se practicaron ECG, tomas de tensión arterial y registro de frecuencia cardiaca antes de la infusión, 1, 4, 8, 12 y 24 horas después del comienzo de la infusión. Se utilizó un modelo 78352A de Hewlett-Packard.

Los análisis de laboratorio se repitieron 7 días después de que los voluntarios recibieran la segunda dosis de CMX. Para la administración de CMX (Meiji Seika Ltd, Japón) el fármaco fue disuelta en 10 ml de suero salino hasta un total de 50 ml y entonces se administró por infusión de 15 min. en una vena periférica del brazo.

El protocolo del EC fue aprobado por el Comité de Ensayos Clínicos del Hospital "La Paz" de Madrid. El consentimiento informado fue obtenido por escrito en todos los voluntarios.

- Toma de muestras.

Se tomaron muestras sanguíneas de 6 ml para el análisis farmacocinético antes de la infusión, al final de la misma y 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 12, 16, y 24 horas después. Fueron obtenidas muestras sanguíneas adicionales (otros 6 ml procedentes de la misma extracción) para la determinación de los poderes bactericidas del suero en los tiempos reseñados con excepción de las 2 y 4 horas postinfusión. El plasma fue usado para las determinaciones HPLC; el suero fue separado por coagulación espontánea y posterior centrifugación, utilizándose para las determinaciones de bioensayo y PBS. Todas las muestras fueron congeladas a -20°C hasta su análisis.

- Métodos analíticos.

Las CMIs y CMBs (tras 6 y 24 h. de incubación) reseñadas en la tabla 5 se realizaron 5 veces para cada cepa de enterobacteriaceas ATCC y B.fragilis ATCC que aparecen en la

tabla 4, tanto en caldo como en pool de suero humano al 50% en caldo suplementado.

Los PBS para las cuatro cepas citadas fueron determinados siguiendo métodos descritos previamente (154), usando para cada sujeto caldo Mueller-Hinton (suplementado con Ca^{++} y Mg^{++}) y combinado (en proporción 1/1) con su propio suero sin inactivar y obtenido antes de la infusión. La concentración final del suero humano sin inactivar fue del 75% (25% de suero obtenido previo a la infusión, 25% caldo de cultivo y 50% muestra sérica a ensayar). Tras 6 y 24 h. de incubación se realizaron subcultivos de las distintas diluciones a agar Mueller-Hinton, en el caso de las bacterias facultativas, o agar Wilkins Chalgren, en el caso de B.fragilis. El PBS se definió como la dilución de la muestra sérica problema capaz de producir la reducción del 99.9% del inóculo inicial. El resultado del PBS fue expresado por el valor del denominador de la dilución. El AUBC fue calculado por la extrapolación de la recíproca de los PBS versus tiempo, usando la regla trapezoidal para el cálculo de áreas.

Los niveles por el método microbiológico se determinaron por difusión en agar utilizando B.subtilis ATCC 6633 (153). Muestras duplicadas (20 mcl) fueron pipeteadas en filtros tipo Whatman de 8 mm de diámetro, que fueron situados en la superficie de placas, inoculadas con la cepa lectora, e incubadas a 37 °C - 18 h. Los estándares fueron preparados en un pool de suero normal obtenido a partir de las muestras tomadas antes de la administración de CMX a los voluntarios. Las zonas de inhibición se enfrentaron a la curva estándar de CMX (con 150, 75, 18.7 y 4.6 mcg/ml como concentraciones de calibración). La reproductibilidad del método fue de 2%, 6% y 4% para concentraciones de 1.5, 12.5 y 100 mcg/ml, respectivamente. El límite de detección fue de 0.5 mcg/ml.

La determinación de los niveles por HPLC fue realizada mediante una modificación del método previamente descrito (153). La cromatografía fue realizada a temperatura ambiental en un

sistema Waters 600E Powerline con un inyector automático Wisp 700 (5 µl de muestra fueron inyectados con un flujo de 1 ml/min), un detector 484 UV/VIS ajustado a una longitud de onda de 270 nm, y una columna C-18 Novapack (Waters Associates, Inc., Milford, Mass, USA). El ácido trimellítico fue utilizado como estándar interno. La fase móvil consistió en un 2% de ácido acético/metanol/acetonitrilo (en una proporción 92/5/3) ajustado a pH 4. Los tiempos de retención, bajo estas condiciones, fueron de 1.6 ± 0.12 min y 1.98 ± 0.2 min para el estándar interno y CMX, respectivamente.

Fueron preparadas y congeladas alícuotas de 4000 mcg/ml de CMX con validate. Diariamente se hicieron diluciones de la solución stock de 12.5 a 200 mcg/ml. Se añadió el estándar interno a las muestras control y a las muestras séricas de los voluntarios; la adición de un volumen igual al 6% de ácido tricloroacético indujo la precipitación. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas y 5 µl del sobrenadante inyectado en la columna.

Tanto para el antibiótico como para el estándar interno las curvas de calibración se dibujaron contrastando la concentración de CMX con las áreas relativas bajo los picos cromatográficos. El análisis de los datos cromatográficos fue realizado con una estación de trabajo Waters Baseline 810 (Waters Associates Inc., Milford, Mass, USA). Se calculó la correlación entre las áreas bajo los picos de CMX y ácido trimellítico, utilizándose para determinar la concentración en la curva de calibración. La reproductibilidad del método fue de 2.6%, 8% y 4.7% para las concentraciones de 1.5, 15 y 150 mcg/ml, respectivamente. El límite de detección fue de 0.1 mcg/ml.

Análisis farmacocinético: se analizaron las concentraciones plasmáticas de CMX por HPLC versus tiempo para cada sujeto usando un programa para datos farmacocinéticos y análisis (SIPHAR Versión 4, Simed, Creteil, Francia). Las concentraciones medidas encajaron en un modelo unicompartimental. Se determinaron los

siguientes parámetros: concentración plasmática en el pico, C_{max} en mcg/ml; volumen de distribución, V en L/1.73 m^2 ; volumen de distribución en estado estacionario, V_{ss} en L/1.73 m^2 ; aclaramiento, CL en mL/min por 1.73 m^2 ; vida media, $t_{1/2}$ en horas; tiempo medio de residencia, MRT en horas; área bajo curva, AUC en mcg.h/mL por 1.73 m^2 .

4.3.2. Inmunomodulación.

Los PMN fueron obtenidos de los voluntarios sanos en muestras sanguíneas adicionales (15 ml), previa administración de CMX y a los 90 min. Los PMN fueron aislados por métodos previamente descritos (161).

Se calculó la curva de concentración plasmática versus tiempo de las 0.5 a 1.5 h. ($AUC_{0-1.5h}$), a partir de las concentraciones determinadas en las muestras plasmáticas obtenidas en ese intervalo de tiempo (final de la infusión, 0.5, 1 y 1.5 h.), para cada sujeto con un programa informático para modelar y analizar datos farmacocinéticos (SIPHAR, Versión 4, Simed, Creteil, France). Los datos farmacocinéticos se relacionaron posteriormente con los índices fagocíticos, pre y post administración de CMX, para establecer el efecto inmunomodulatorio del antibiótico.

El efecto de CMX sobre la capacidad de adherencia de los PMN a superficies plásticas o fibra de nylon se estudió por métodos previamente descritos (155).

El estudio de la fagocitosis se efectuó sobre una cepa de Candida albicans, sobre la que CMX no tiene actividad a concentraciones fisiológicas. De esta forma, estudiamos el efecto de CMX exclusivamente sobre los PMN, al excluir de los resultados observados cualquier posible actividad de CMX sobre la diana de los PMN.

El estudio sobre fagocitosis fue realizado como sigue: una

suspensión de Candida albicans opsonizada fue añadida tanto a los PMN obtenidos previa infusión de CMX como a los PMN tratados "in vivo" con CMX, en una proporción 1/1 (levadura/PMN). La suspensión fue incubada a 37°C-60 min, y se añadió azul de metileno (0.01%). El porcentaje de PMN con >1 levadura asociada (adherida o ingerida) fue determinado por la observación microscópica de 200 PMNs consecutivos. Las células fagocitadas aparecían teñidas cuando carecían de viabilidad. Se estudiaron 4 índices: a) número de PMN-levaduras asociadas por 100 PMN; b) eficacia de fagocitosis (número de levaduras fagocitadas por 100 PMN); c) eficacia microbicida (número de levaduras ingeridas muertas por 100 PMN); d) poder microbicida (relación de levaduras muertas respecto al total de levaduras ingeridas, vivas o muertas). Cada uno de los ensayos se realizó por duplicado.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

5.1. Efecto antibiótico sobre la masa bacteriana a lo largo del tiempo.

Con respecto al estudio número 4 (actividad bacteriolítica) se establecieron, tanto para los experimentos realizados cuando el antibiótico se añadía a un inóculo bajo (3×10^6 ufc/ml) como cuando se añadía a un inóculo alto (4×10^8 ufc/ml, densidad óptica 30%), los puntos definidos por el tiempo (11 tiempos: 0 a 20 horas, a intervalos de 2 horas) y la densidad óptica (correspondiente a cada tiempo) de los registros turbidimétricos. Se realizó una comparación de medias de datos pareados.

El estudio se realiza para los 2 antibióticos que tengan registro más próximo entre sí, y produzcan un mayor descenso en la masa bacteriana, ya que, de existir diferencias entre éstos, también existirán entre el que produzca mayor decremento de masa bacteriana a lo largo del tiempo y los demás.

Las concentraciones de antibiótico se miden en base CMI

convencional, comparándose concentraciones de 0.5 y 1 CMI para el inóculo bajo, y concentraciones de 2 CMI para inóculo alto.

5.2. Actividad bactericida.

Para el estudio de la magnitud de la actividad bactericida, su velocidad de consecución, y el efecto del suero humano sobre la misma (estudios números 7 y 8) se utilizó para los cálculos el \log_{10} del recuento de colonias viables. En el análisis estadístico fue usado el test no paramétrico de Mann-Whitney.

Se consideró un descenso significativo del inóculo inicial (con independencia de su tamaño) al mayor o aproximadamente igual a 2.3 unidades logarítmicas (es decir, ≥ 200 veces), en todos los experimentos de viabilidad bacteriana a lo largo del tiempo.

5.3. Relación entre el decremento de mortalidad en el modelo animal discriminativo y parámetros farmacocinéticos y microbiológicos.

Se estudió para CMX, CFX y CTX. Se analizaron las relaciones de las concentraciones inhibitorias (a dos inóculos, con el fin de estudiar la influencia del efecto inóculo "in vivo"; y con dos medios de cultivo, Mueller-Hinton y "completo", con el fin de estudiar la influencia del efecto osmolar), y concentraciones líticas (30% y 75%), como valores numéricos de parámetros de susceptibilidad "in vitro" (TSA), con pico sérico, AUC y duración de los niveles de antibiótico (tanto en la fase beta y expresado en unidades $t_{1/2}$, como interdosis y expresado en horas de antibiótico total o libre), como parámetros farmacocinéticos. La CMB, al ser antibióticos bactericidas, presenta valores semejantes a la CMI estándar, por lo que su estudio se puede hacer concordante con el de la CMI estándar, en el caso de estos tres antibióticos tratados.

El estudio se llevó a cabo de dos formas: estática y dinámica. Como forma estática se estudió el grado de dispersión

de los valores de cada relación de parámetro farmacocinético con cada TSA, tomados dos a dos, para la dosis mínima que produjera una mortalidad inferior al 5%. Como forma dinámica se estudió la equiparación de las curvas construidas a partir de las variaciones en el decremento de mortalidad y las relaciones farmacocinéticas/TSA, con el incremento de las dosis. Se busca la relación que produzca menor grado de dispersión de valores para los antibióticos estudiados (estudio estático), o curvas similares al incrementar la dosis (estudio dinámico), como la de mayor valor predictivo de eficacia.

Se tomaron como puntos de mortalidad los obtenidos como resultado del estudio número 9 (modelo animal discriminativo), y se estableció el decremento de mortalidad para cada dosis de cada antibiótico en comparación con el control (ausencia de tratamiento antibiótico).

Se consideró dosis mínima efectiva aquella que produjese una mortalidad $\leq 5\%$. Dosis superiores fueron consideradas como productoras de mortalidad del 0% y dosis inferiores (en caso de no realizarse) como productoras de mortalidad $\geq 25\%$ (dentro del intervalo de confianza), sobre la base de estudios previos con la misma especie bacteriana (aunque distinta cepa) e idénticas CMIs (tanto inóculo alto como bajo) (72).

En una primera fase se construyeron las curvas a partir de los puntos "decremento de mortalidad" (abscisas) y niveles de antibiótico (ordenadas). En una segunda fase se construyeron las curvas de los índices terapéuticos a partir de la primera fase, dividiendo los niveles de antibiótico (ordenadas) por los resultados de los TSA (CMI en Mueller-Hinton y medio completo, con dos inóculos, CLM 30%-75%).

Se determinó la relación entre el decremento de porcentaje de mortalidad y los niveles, o índices terapéuticos, en su caso, a partir de 10 puntos, reales o interpolados, asumiendo que niveles intermedios para un antibiótico dado producirían una

respuesta biológica de mortalidades intermedias.

Este mismo proceso se realizó para el estudio de la relación de otros parámetros farmacocinéticos con los TSA (AUC y su relación con las concentraciones inhibitorias y líticas, número de $t_{1/2}$ que el antibiótico sobrepasa el nivel sérico determinado por cada TSA, tiempo interdosis que el nivel sérico, total y libre, sobrepasa cada TSA). Las $AUC_{0-\infty}$ (AUC) se calcularon para cada dosis a partir de los datos experimentales del grupo control (niveles tomados a los 5, 15, 30, 60 minutos de la dosis). El tiempo de antibiótico, a partir del pico sérico (fase beta), sobre cada TSA para cada dosis antibiótica se determinó contrastando el valor de los mismos sobre la curva de la fase beta sérica de cada antibiótico, construida a partir del dato experimental pico sérico, y el dato previo de $t_{1/2}$ sérico (beta), para cada antibiótico en esta especie animal; para equiparar los tres antibióticos, el tiempo se expresó en número de $t_{1/2}$ que el fármaco supera cada TSA a partir del pico sérico. Para calcular el tiempo que el nivel sérico interdosis supera el valor de cada TSA, se añadió, a los tiempos calculados a partir del pico sérico (fase beta), el tiempo sobre cada TSA en la fase alfa, calculado a partir de las curvas farmacocinéticas construidas mediante los datos experimentales del grupo control (tiempos de extracción: 5, 15 y 30 minutos). Para calcular el tiempo de antibiótico libre sobre cada TSA se contrastaron éstos con las curvas construidas a partir de los datos anteriores (fases alfa y beta) e información previa sobre la unión a proteínas de cada antibiótico en esta especie animal.

Posteriormente, y como en el caso del pico sérico, se construyeron las curvas a partir de los puntos "decremento de mortalidad" (abscisas) y AUC, o su relación con los distintos TSA, número de $t_{1/2}$ (beta) sobre cada TSA, o tiempo interdosis sobre cada TSA (ordenadas). Se determinó la relación dinámica entre el decremento de mortalidad (al incrementar las dosis) y las razones de parámetros farmacocinéticos y TSA a partir de 10 puntos, reales o interpolados, asumiendo que niveles intermedios

para un antibiótico dado producirían una respuesta biológica de mortalidades intermedias.

Se compararon las relaciones medias obtenidas entre los 3 fármacos mediante análisis de la varianza, y comparación múltiple de dichas medias mediante la prueba de Newman Keuls.

La relación de la razón "parámetro farmacocinético/TSA" con "decremento de mortalidad" que equipare las tres curvas construidas para CMX, CFX y CTX, o produzca una ausencia de diferencias significativas entre ellas, será considerada como la predictora de eficacia con mayor exactitud en este modelo animal de respuesta dicotómica (ausencia o presencia de mortalidad), desde el punto de vista dinámico. Desde el punto de vista estático, la razón "parámetro farmacocinético/TSA" que presente menor dispersión de valores para los tres antibióticos, con la dosis mínima que produzca una mortalidad $\leq 5\%$, será considerada como la predictora de eficacia con mayor exactitud.

5.4. EC en Fase I.

5.4.1. Farmacocinética y farmacodinamia (estudios números 14 y 15).

Los tests de Student y de Mann-Whitney se utilizaron para la comparación entre grupos (1 g. versus 2 g.). El test de linealidad fue utilizado para ambas dosis.

Los niveles medidos por HPLC y los datos de PBS fueron transformados logarítmicamente; la correlación para las concentraciones medias y datos de PBS fue realizada usando un análisis de regresión con el software statview graphics (Abacus Concepts Inc, California, USA) para equipo Mackintosh. El análisis de regresión también se realizó para las concentraciones por bioensayo y HPLC.

Para analizar la relación potencial entre los PBSS,

concentraciones plasmáticas y parámetros de susceptibilidad (CMI, CMB_{6h} y CMB), un valor para el PBS ≥ 8 fue considerado significativo (113) y adecuado para los niveles en el valle (154). Como la actividad bacteriostática o bactericida de una muestra sérica puede esperarse cuando los niveles de antibiótico excedan la CMI o la CMB de la cepa probada, se contó para cada cepa (con respecto a los niveles HPLC de CMX) el número de muestras con PBS ≥ 8 y concentración antibiótica superior a cada parámetro de susceptibilidad "in vitro", junto con aquéllas con PBS < 8 y concentración antibiótica menor que cada parámetro de susceptibilidad "in vitro". Entonces se comparó para cada cepa el porcentaje de muestras séricas que cumplían las anteriores condiciones con respecto a la CMI, CMB_{6h} y CMB, con el fin de averiguar cuál de estos parámetros se relaciona mejor con valores de PBS < 6 ó ≥ 8 .

5.4.2. Inmunomodulación (estudio número 16).

Con respecto a los índices reseñados en el apartado métodos estudiamos:

- Comparación de porcentajes medios con respecto al control (muestras plasmáticas previas a la infusión del antibiótico) de cada grupo (1 g. y 2 g.): test de Student para muestras independientes.
- Comparación de valores medios absolutos entre los 3 grupos establecidos (control, 1 g. y 2 g.): t de Student para muestras independientes.
- Efecto de los niveles a tiempo 0 y 90 min. y $AUC_{0-1.5h}$ sobre la adhesión media de candidas y PMN: correlación lineal de Pearson y ajuste de regresión.
- Relación entre nivel T=0 y $AUC_{0-1.5h}$ y nivel T=1.30h. y $AUC_{0-1.5h}$: correlación lineal de Pearson y ajuste de regresión.

Se consideró estadísticamente significativo $p < 0.05$ y $Beta = 0.2$, para todas las pruebas estadísticas.

IV. RESULTADOS

En el material y métodos se ordenaron los estudios partiendo de los dos parámetros fundamentales cuando se planifica el desarrollo postoxicológico y preterapéutico de un antibiótico: centros donde se realizan los distintos estudios e investigadores que participan en los mismos.

Debido a la interrelación que existe entre los diversos estudios y a la creciente complejidad que sigue la investigación de aspectos biológicos de un nuevo fármaco, los resultados se ordenarán desde el cribaje de actividad, pasando por el estudio de otras facetas de dicha actividad, hasta su actividad "in vivo" (modelo animal) y su posible predicción, para acabar con sus efectos en humanos (voluntarios sanos), donde finaliza el desarrollo preterapéutico.

1. ACTIVIDAD BACTERIOSTÁTICA.

En la tabla 8 se reseña la actividad de CMX frente a distintos aislamientos bacterianos [esta tabla está tomada del poster presentado por Martínez Beltrán et al. en el XXX ICAAC (Atlanta, 1990) (137)].

El CMX inhibe el 90% de las cepas de E.coli, Klebsiella, P. mirabilis y Salmonella a concentraciones ≤ 0.5 mcg/ml. Su actividad bacteriostática es 4 a 16 veces mayor que la de CFX, pero menor que las cefalosporinas de 3ª generación desde el punto de vista inhibitorio.

Esta actividad parece no afectada por la presencia en estas especies bacterianas de las nuevas betalactamasas de amplio espectro (TEM-3,4,6,8,9, SHV-2, o CAZ-1,2), y cuando se estudió este efecto al añadir resistencia de permeabilidad en mutantes OmpF de E.coli portadoras de estas betalactamasas la CMI aumentó de 2 a 4 veces (137), dentro del rango de sensibilidad.

No pueden considerarse susceptibles a CMX gram negativos no

fermentadores ni enterobacteriaceas pertenecientes a los géneros Enterobacter, Citrobacter y Serratia.

En este estudio la CMI₉₀ para Bacteroides fragilis resultó de 2 mcg/ml, 4 a 16 veces más activo que CFX y CTT.

Con respecto al Bacteroides grupo fragilis (estudio número 10), CMX presentó una CMI₅₀ de 4 mcg/ml versus CFX que presentó una CMI₅₀ de 32 mcg/ml (Tabla 9). Considerando un "breakpoint" de 16 mcg/ml, el 50% de las cepas resistentes a CFX son sensibles a CMX. No se presentaron resistencias al metronidazol y un 36% a clindamicina (tomando un "breakpoint" de 8 mcg/ml).

Al estudiar la interacción de CMX con otros antibióticos (estudio número 13), sobre distintas cepas bacterianas (tabla 10), se demuestra indiferencia con CTD en el 100% de los casos, y sinergismo con AMK en el 93% de los casos (indiferencia en el resto), frente a los aislados de enterobacteriaceas.

En la tabla 11 se presentan parámetros de susceptibilidad "in vitro" (CMI a distintos inóculos, en caldo Mueller-Hinton o medio completo, CMBs tras 6 y 24 horas de incubación, y distintas CLMs según el porcentaje de decremento en densidad óptica), tomados de los estudios números 4, 5, 7 y 8, frente a cepas control ATCC. Como vemos, las cefamicinas, a diferencia de otros antibióticos, no varían su CMI al variar el inóculo. Es decir, la actividad inhibitoria no está influida por la variación del tamaño del inóculo.

2. ACTIVIDAD BACTERICIDA.

En la tabla 11 se expresan las CMBs tras 6 y 24 horas de incubación de las cepas ATCC.

2.1. Modulación por el tamaño del inóculo.

Se tomó como variable de eficacia la disminución mayor o igual a 2.3 unidades logarítmicas del inóculo inicial empleado. El motivo de esta elección es equiparar esta definición con la de efecto inóculo (variación significativa de la CMI, ≥ 4 veces, al variar el inóculo aproximadamente 2.3 unidades logarítmicas), ya que se realizaron experimentos de viabilidad a distintos inóculos.

En los experimentos turbidimétricos realizados en el estudio número 4 se utilizaron cultivos en medio completo. En estos cultivos, cuando se añadieron los antibióticos a una densidad óptica del 30% (inóculo de aproximadamente 5×10^8 ufc/ml), también se tomaron alícuotas a los tiempos 0, 2, 5 y 20 horas, tras la adición antibiótica, para los recuentos de colonias utilizando "Spiral System". En el gráfico 1 vemos dichos recuentos para CMX, CFX y CTZ.

Al relacionar estos datos con los de la tabla 11 se observa que para obtener descensos significativos en los recuentos (mayores o iguales a 2.3 log., es decir mayor o igual a 200 veces con respecto al inóculo inicial), a las 2, 5 y 20 horas, es necesario superar de 2 a 4 veces la CMI_T , en el caso de los fármacos que no presentan efecto inóculo (2 para CMX y 4 para CFX), a diferencia del que lo presenta (CTZ) para el que es necesario alcanzar una concentración de 16 veces la CMI_T . Si llevamos a cabo el ejercicio con CMI realizadas en medio completo a ambos inóculos (10^5 , 10^8 ufc/ml), se observa que el efecto definido sucede con concentraciones de antibiótico próximas al valor de la CMI_{NCIG} (de 0.5 a 2 CMI_{NCIG}), para los 3 antibióticos. Excluir la osmolaridad del medio, al utilizar un medio completo, tiene relevancia en el caso de CFX, ya que las CMI realizadas en medio completo o Mueller-Hinton no sufren variación para CTZ y CMX, pero sí para CFX (8 versus 2 mcg/ml).

Si se toma la CMI convencional es necesario superarla en 2

veces para obtener el efecto definido en el caso CMX, 8 en el caso CFX y 16 en el caso CTZ. De cualquier forma, parece que el mejor predictor del descenso significativo del recuento de colonias, a partir de un inóculo alto, es la CMI_{MCI_G}, cuando las curvas de muerte bacteriana se realizan en medio completo, con independencia del antibiótico que se ha probado.

CMX no presenta efecto inóculo ni efecto osmolar. CFX no presenta efecto inóculo, pero sí efecto osmolar. CTZ presenta efecto inóculo pero no efecto osmolar. En los experimentos turbidimétricos a partir de los cuales se realizaron los contajes bacterianos a distintos tiempos, el efecto del antibiótico sobre la disminución de ufc/ml a lo largo del tiempo está modulado por el efecto inóculo, ya que al determinar las CMI en medio completo, y al realizar la actividad bactericida a partir de inóculos iniciales altos y en medio completo, excluimos el factor osmolaridad.

2.2. Modulación por la osmolaridad ambiental.

Veamos la influencia del factor osmolaridad, al realizar las curvas de muerte bacteriana en caldo Mueller-Hinton, a partir de inóculos de aproximadamente 5×10^6 ufc/ml. Estudiamos la disminución del inóculo inicial, para E.coli ATCC 25922, tras 6 y 24 horas de exposición. En este estudio (número 7) (142), todos los recuentos fueron <1 log. a las 24 horas sobre E.coli, ya que todos los fármacos estudiados son tradicionalmente considerados bactericidas. En la tabla 12 (concentraciones de 2, 4 y 8 mcg/ml) y en el gráfico 2 (concentraciones de 2 y 4 mcg/ml) se observan, respectivamente, los resultados de los recuentos bacterianos y las curvas de muerte bacteriana, estudiando en esta sección las realizadas en ausencia de suero humano. En la tabla 13 se muestran las CMI realizadas con inóculo estándar en caldo Mueller-Hinton y medio completo, así como los decrementos absolutos y en unidades logarítmicas de la viabilidad bacteriana tras 6 horas de incubación, con 8, 4 y 2 mcg/ml de los antibióticos estudiados, de un inóculo inicial de 5×10^6 ufc/ml.

Si definimos como un efecto osmolar significativo el incremento mayor o igual a 4 veces el valor de la CMI al realizarse en medio completo, con respecto a la estándar, observamos un efecto osmolar significativo en CFX y CTX, y ausencia del mismo en CTZ, CMX e IMP.

Los fármacos que presentan un efecto osmolar (CFX y CTX) producen un decremento del inóculo inicial de 1000 veces para las concentraciones de 8 y 4 y de 100 veces para la concentración de 2; mientras que los antibióticos que no presentan este efecto producen un decremento del orden de 10000 veces con independencia de la concentración ensayada.

Así, en el gráfico 2 observamos las curvas de muerte bacteriana para las concentraciones de 2 y 4 mcg/ml de los distintos antibióticos frente al E.coli ATCC 25922. Las diferencias en los recuentos bacterianos a las 6 horas son estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los fármacos que no presentan efecto osmolar (CTZ y CMX) y los que sí lo presentan (CTX y CFX), tomados dos a dos, con independencia de la generación cefalosporínica a la que pertenezcan y la presencia de efecto inóculo, para las concentraciones de 2 y 4 mcg/ml. Sin embargo, este hecho desaparece a la concentración de 8 mcg/ml para todos los pares de antibiótico, excepto para las cefalosporinas de 3ª generación (CTZ vs CTX). Parece ser que el efecto osmolar disminuye en su intensidad al incrementarse la concentración. Incluso para las cefalosporinas de 3ª generación, las comparaciones CTZ vs CTX presentan una mayor significación estadística ($p < 0.001$) para las concentraciones de 2 y 4 mcg/ml, que para la de 8 mcg/ml ($p < 0.01$).

Las diferencias de los antibióticos tomados dos a dos no variaron con la adición de suero humano al 10%. IMP no presenta efecto osmolar y se comportó como tal, al igual que CTZ y CMX presenta diferencias significativas con los antibióticos cuya acción queda influenciada por la osmolaridad ambiental (CTX y

CFX).

Al comparar las cefalosporinas de 3ª generación (CTZ y CTX), que presentan efecto inóculo, observamos que el fármaco que no presenta efecto osmolar (CTZ) produce una disminución del inóculo inicial 30 veces superior para las concentraciones de 2 y 4 mcg/ml y 25 veces superior para la de 8 mcg/ml, que el fármaco que lo presenta (CTX).

Cuando estudiamos las cefamicinas, podemos comparar CFX y CMX ya que ambas carecen de efecto inóculo, pero CFX presenta efecto osmolar y CMX no. CMX produce una disminución del inóculo inicial de 32, 25 y 7.5 veces mayor a CFX en concentraciones de 2, 4 y 8 mcg/ml, respectivamente. Nuevamente, parece ser que el efecto osmolar disminuye su intensidad al aumentar la concentración antibiótica. Si expresamos las concentraciones antibióticas en unidades CMI_{mc} para estos dos antibióticos, observamos que disminuciones de orden >1000 veces (3.6 y 3.9, unidades logarítmicas para CFX y CMX, respectivamente), del inóculo inicial, se consiguen a concentraciones peri-CMI; mientras que a concentraciones correspondientes a la CMI realizada en caldo Mueller-Hinton, incluso con inóculo alto (2 mcg/ml para ambos antibióticos) se consiguen disminuciones del orden de las centenas para CFX (250 veces) y de los millares para CMX (8000 veces).

Cabe destacar la influencia del efecto inóculo en la actividad bactericida (al excluir el factor osmolaridad al utilizar medio completo e inóculo alto en la determinación de la CMI y en la realización de las curvas de muerte bacteriana) y la influencia del efecto osmolar en dicha actividad (al excluir el efecto inóculo al realizar el experimento sobre un inóculo fijo - 5×10^6 ufc/ml-, en medio habitual no "fisiológico", sobre fármacos que no presentan efecto inóculo: CFX y CMX). Por ello, parece más predictiva de la actividad bactericida, medida como decremento de la viabilidad bacteriana, la CMI realizada de forma que tenga en cuenta ambos efectos (inóculo y osmolar), es decir,

la CMI_{MICR} .

2.3. Velocidad de acción bactericida.

En el gráfico 3 se muestran las curvas de muerte bacteriana sobre E.coli ATCC 25922, de CTZ, CTX, CMX y CFX, a concentraciones de 4 CMI, y sobre inóculos iniciales de 5×10^5 y 10^8 ufc/ml., en caldo Mueller-Hinton. En la tabla 14 se muestran las tasas de muerte bacteriana entre 0 y 3 horas como expresión de la velocidad de acción bactericida. Se define la tasa de muerte entre 0 y 3 horas como: $(\log \text{ ufc a } t_{3h} - \log \text{ ufc a } t_{0h}) / t_{3h} - t_{0h}$. Podemos observar la influencia del efecto inóculo sobre la actividad bactericida mediante la comparación de las tasas de muerte (entre 0 y 3 h) entre fármacos que poseen efecto inóculo (CTX y CTZ) y fármacos que carecen de él (CMX y CFX). Los fármacos que no presentan efecto inóculo, muestran una tangente a la curva (establecida entre los puntos temporales 0 y 3 horas) con un ángulo (con respecto al eje de ordenadas) significativamente menor que los fármacos que sí lo presentan. Así, encontramos diferencias significativas entre las tasas de muerte bacteriana conseguidas a partir de inóculo inicial alto y las resultantes de inóculo inicial estándar para los fármacos que poseen efecto inóculo (CTX y CTZ), pero no para los que no lo presentan (CFX y CMX).

Con respecto a la medición del efecto en unidades tiempo, un decremento significativo (al menos 2.3 log.) del inóculo inicial de 5×10^5 ufc/ml. se consigue a las 3 horas de incubación con los antibióticos que no presentan efecto inóculo (CMX y CFX), a concentraciones de 4 CMI. En las mismas condiciones, y para conseguir el mismo objetivo, es necesario un tiempo mayor (más de 6 horas) para las cefalosporinas que presentan efecto inóculo. Son necesarios unos tiempos similares para disminuir en la misma magnitud el inóculo inicial de 10^8 ufc/ml.

Como parte del experimento número 4 estudiamos la modulación

de la actividad bactericida por el efecto inóculo, sobre un inóculo inicial alto (similar a los que ocurren "in vivo") y en medio "fisiológico" (medio completo para excluir el efecto osmolar). La CMI_{MCIC} resultó más predictiva de la actividad bactericida. Lógicamente, la concentración antibiótica debía superar un menor número de veces la CMI_{MC} para los fármacos que no presentaban efecto inóculo. Este hecho también ocurría al tomar como unidad de medida la CMI convencional, indicando un mayor peso específico del efecto inóculo (versus efecto osmolar sobre la actividad bactericida).

Concatenando los distintos experimentos, observamos que expresando las concentraciones en unidades CMI, los fármacos que carecen de efecto inóculo no sólo necesitan una concentración menor para obtener un decremento significativo (de al menos 200 veces) del inóculo inicial estándar, sino que éste descenso es obtenido, además, en un tiempo inferior.

El efecto inóculo tiene una influencia directa sobre la actividad bactericida de los fármacos estudiados, tanto desde el punto de vista de la magnitud de la misma como de la rapidez de su consecución, con independencia del inóculo inicial empleado.

2.4. Efecto del suero humano en la actividad bactericida.

En el estudio número 8 estudiamos el efecto del suero humano en la actividad bactericida de concentraciones de 2, 4 y 8 mcg/ml de CTZ, CTX, CFX, CMX e IMP sobre un inóculo inicial de 5×10^6 de E.coli ATCC 25922 ó B.fragilis ATCC 25285, tras 6 y 24 horas de incubación.

En la tabla 12 observamos la ausencia significativa del efecto del 10% de suero humano en la actividad bactericida de los distintos betalactámicos frente a E.coli ATCC 25922.

En la tabla 15 se observan los recuentos bacterianos tras 6 y 24 horas de incubación de 8 mcg/ml de los distintos

betalactámicos frente a B.fragilis ATCC 25285, tanto en presencia como en ausencia de suero humano. El efecto de las concentraciones, con y sin 10% de suero humano, de 2 y 4 mcg/ml, frente a E.coli ATCC 25922, se representa en el gráfico 2; el efecto de la concentración de 8 mcg/ml (con y sin 10% de suero humano), frente a E.coli ATCC 25922 y B.fragilis ATCC 25285, se representa en el gráfico 4.

A diferencia del efecto del suero humano en la actividad bactericida de los betalactámicos sobre E.coli ATCC 25922, en el caso de CMX frente a B.fragilis ATCC 25285 existe una actividad bactericida significativamente más alta de CMX en presencia de suero humano, aunque este hecho no ocurre con el resto de los antibióticos ensayados. Este aumento de actividad bactericida de CMX en presencia de suero humano, tras 6 y 24 horas de exposición, es estadísticamente significativo ($p < 0.05$) a la concentración de 8 mcg/ml (142), a diferencia de concentraciones inferiores (2 y 4 mcg/ml). Este hecho hace pensar que el efecto del suero humano sobre la actividad bactericida de CMX es concentración dependiente, con respecto al antibiótico.

2.5. Efecto postantibiótico.

En el estudio número 11 aplicamos experimentos de viabilidad bacteriana para la determinación del efecto postantibiótico (diferencia de tiempo, entre cultivos tratados y controles, necesario para aumentar las poblaciones bacterianas en 1 log., después de la eliminación del antibiótico tras 1 hora de exposición a 1 y 10 CMI). Las cinéticas de muerte bacteriana y crecimiento se realizaron sobre cultivos puros de E.coli y S.aureus, y mixtos de E.coli y B.fragilis. En la tabla 16 se presentan las CMI a CMX del S.aureus, y E.coli-B.fragilis, tanto aisladamente como en conjunto. En la misma tabla se presentan los valores de los PAEs expresados en horas.

Considerando un PAE significativo superior a 1 hora, sólo puede considerarse valorable frente a S.aureus y E.coli a

concentraciones de 10 CMI y B.fragilis a partir de 30 CMI.

CMX, como la mayoría de los betalactámicos, no presenta PAEs significativos, si tenemos en cuenta, como veremos, las concentraciones séricas conseguidas en voluntarios sanos.

3. ACTIVIDAD BACTERIOLÍTICA.

El estudio número 4 consistió en la determinación de la respuesta turbidimétrica y morfológica (además de bactericida, como ya se ha visto) de inóculos altos de E.coli a CMX, CFX, CTZ, CTX e IMP (138) (139).

En el gráfico 5 se representan las respuestas turbidimétricas del E.coli ATCC 25922 en medio completo, tanto cuando el antibiótico era añadido a tiempo 0 (parte izquierda del gráfico) como cuando lo era en la fase logarítmica de crecimiento (opacidad del 30%, inóculo alto) (parte derecha del gráfico). Estas figuras están tomadas del póster indicado en la cita bibliográfica 139 ó del trabajo referenciado en la 138.

En la tabla 11 se reseñan las CMAs y CMIs turbidimétricas de los distintos antibióticos, tomadas del gráfico 5 izquierda. En la tabla 17 se muestra el tanto por ciento de reducción en la densidad óptica (con respecto a la curva normal de crecimiento) con distintos niveles de antibiótico, cuando éste se añadió al 30% de opacidad; esta tabla está tomada del gráfico 5 derecha y de otros registros turbidimétricos aportados por el estudio número 4. Establecemos el valor del decremento de densidad óptica conseguida para un nivel antibiótico determinado para distintos intervalos: 15% (10%-20%), 30% (25%-35%), 45% (40%-50%), 60% (55%-65%), 75% (70%-80%) y 90% (85%-95%), a partir de la tabla 17. Definimos una CLM determinada como la concentración que consigue una disminución de la densidad óptica (bacteriolisis) de al menos el valor expresado en su subíndice. En la tabla 18 se muestran las CLMs, de CLM₁₅ a CLM₉₀. Cuando dos concentraciones

sucesivas de las mostradas en la tabla 17 consiguen un mismo decremento de turbidez se considera el modelo saturado y la imposibilidad de alcanzar una mayor bacteriolisis (disminución de densidad óptica).

Observamos que las cefalosporinas de 3ª generación y el IMP tienen un límite de acción bacteriolítica, dentro del rango de concentraciones experimentadas. No es posible, para estos fármacos, conseguir una disminución de la densidad óptica superior a aproximadamente el 75%, por lo cual no presentan valores para la CLM_{90} .

En la predicción de la magnitud de bacteriolisis observamos nuevamente la necesidad de aproximación, para la consecución de decrementos de densidades ópticas similares o superiores al 75%, a la CMI_{MCIG} , para todos los fármacos ensayados. Esto es debido, en las cefalosporinas de 3ª generación, al aumento de la CMI convencional al incrementar el inóculo (efecto inóculo); y al aumento, con respecto a la CMI convencional, de la CMI_{MC} al excluir el factor osmolaridad (efecto osmolar en la bacteriolisis) en el caso de CFX. Lógicamente, las CMI a distintos inóculos, en medio convencional o en medio completo, presentan un mismo nivel de predicción de la CLM_{75} en el caso de CMX, ya que presentan un mismo valor al carecer este fármaco de efecto inóculo y efecto osmolar.

Al estudiar el efecto antibiótico sobre la biomasa bacteriana a lo largo del tiempo, y a partir de un inóculo inicial alto, podemos observar, en el gráfico 5 (parte derecha), la ausencia de disminución significativa en la densidad óptica con las cefalosporinas de 3ª generación a concentraciones iguales o inferiores a 4 CMI. Este hecho no ocurre con las cefamicinas que carecen de efecto inóculo.

En otro intento de estudiar el efecto osmolar, comparamos la disminución de la biomasa a lo largo del tiempo para las dos cefamicinas que presentan una CMI_{10} (para descartar el efecto

inóculo) de idéntico valor: 2 mcg/ml. CMX obtiene disminución máxima y similar de la biomasa a partir de concentraciones mayores o iguales a la CMI. Las disminuciones significativas de CFX se obtienen a partir de concentraciones de 2 CMI. A esta última concentración CMX produce un decremento de la biomasa significativamente mayor ($p < 0.001$) que CFX ($60.9\% \pm 33.2\%$ vs $42.6\% \pm 26\%$). CFX presenta efecto osmolar, y cuando se realiza la CMI en medio completo (para evitar la influencia del factor osmolaridad) resulta un valor de 8 mcg/ml, concentración igual a la mínima necesaria para conseguir el máximo decremento de la biomasa a lo largo del tiempo.

Con las cefalosporinas de 3ª generación (presentan efecto inóculo), CTZ no presenta efecto osmolar y sí CTX (CMI en medio completo igual a 4 veces CMI convencional). Parece ser que el efecto osmolar también se manifiesta en este grupo de fármacos ya que en el caso de CTX es necesario superar 33 y 66 veces la CMI convencional para la consecución de la $CLM_{30\pm}$ y $CLM_{75\pm}$, respectivamente, mientras que en el caso de CTZ estas CLMs se consiguen con niveles de 8 y 16 veces la CMI.

La influencia del efecto inóculo sobre la disminución de la biomasa a lo largo del tiempo es patente ya que CTZ, CTX e IMP presentan efecto inóculo, y existen diferencias significativas ($p < 0.001$) entre CMX (ausencia de ambos efectos) y estas cefalosporinas de 3ª generación con respecto a los decrementos temporales de densidad óptica con concentraciones antibióticas de 1 a 4 CMI.

Nuevamente, y para evitar en lo posible los efectos inóculo y osmolar, cuando se realiza la CMI con inóculo alto y en medio completo el valor resultante es más predictivo del decremento de la biomasa bacteriana a lo largo del tiempo para los fármacos ensayados. Los registros turbidimétricos realizados para el estudio número 4 muestran la necesidad de concentraciones peri- CMI_{MCTG} para obtener variaciones turbidimétricas significativas.

4. EFECTO DE CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS.

En la tabla 11 se representan las CMA para los antibióticos estudiados. Para todos los antibióticos estudiados la CMA osciló entre 1/2 y 1/4 de CMI.

Al añadir el antibiótico a tiempo 0 en los experimentos turbidimétricos en medio completo, observamos también diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los registros de CMX y CFX a concentraciones de 0.5 CMI ($47\% \pm 38\%$ vs $19.7\% \pm 13\%$) y 1 CMI ($74.5\% \pm 37.3\%$ vs $40.1\% \pm 36.2\%$) cuando ésta se realiza por metodología convencional, desapareciendo las diferencias a concentraciones de 0.5 y 1 CMI_{MC}. Esto parece indicar la influencia del efecto osmolar sobre la cinética de crecimiento bacteriano a lo largo del tiempo cuando se parte de inóculos estándar. Con respecto a las cefalosporinas de 3ª generación las diferencias existentes ($p < 0.05$) entre CTX y CTZ a concentraciones de 1 CMI se soslayan al utilizar unidades CMI_{MC}.

Como conclusión cabe resaltar la influencia del efecto inóculo y el efecto osmolar en la actividad lítica de las cefalosporinas sobre inóculos altos, y la influencia del efecto osmolar sobre la cinética del crecimiento bacteriano de un inóculo estándar.

5. EFECTOS MORFOLÓGICOS CELULARES.

En los experimentos turbidimétricos con inóculo alto se tomaron muestras para su observación microscópica a 1 hora de la adición de antibiótico (138). Cuando se añadió el antibiótico a concentraciones peri-CMI (realizada en medio completo) al cultivo en fase logarítmica, CMX y CFX revelaron formación de esferoplastos, mientras que cefalosporinas de 3ª generación produjeron filamentos con concentraciones de 1-4 CMI. IMP mostró un redondeamiento celular progresivo con posterior lisis.

En la tabla 19 se expresan los recuentos bacterianos y la densidad óptica a lo largo del tiempo, y con distintas concentraciones (expresadas en unidades peso/volumen y unidades CMI), obtenidos de los registros turbidimétricos y registros de viabilidad del estudio número 4. El tiempo está contabilizado a partir de la adición del antibiótico (t=0 horas).

Una manera de estudiar el efecto morfológico de la exposición antibiótica es comparar la biomasa con la viabilidad, obteniendo una aproximación a la tasa de biomasa (densidad óptica) correspondiente a 1 ufc.

En los experimentos de microscopía se observaba filamentación para las cefalosporinas de 3ª generación a concentraciones de 1-4 CMI. Así, con CTZ, tras exposición antibiótica de 2 a 5 horas a concentraciones de 1-4 CMI, se obtiene un decremento de 0% en la densidad óptica junto con una disminución superior al 99% en la viabilidad. La ausencia de disminución en la masa bacteriana unida a la disminución de ufc implica una mayor masa por unidad celular, lo cual es compatible con filamentación observada por microscopía. Este hecho no ocurre con las cefamicinas, de tal forma que a concentraciones de 1-4 CMI existe una disminución patente de la biomasa (89% para CMX y al menos 67% para CFX), al igual que en la viabilidad (>97%).

En la tabla 20 observamos la biomasa que corresponde a los recuentos bacterianos obtenidos tras exposición a concentraciones antibióticas de 0-16 CMI, hasta la saturación del modelo. No se expresan recuentos menores de 4×10^5 , ya que no se consiguió disminuir el número de ufc/ml por debajo de 10^5 en ninguno de los antibióticos estudiados tras 5 horas de exposición (aunque a 4 CMI para CMX y 8 CMI para CFX los recuentos estuvieron por debajo del límite de detección, a t=20 h.; este hecho no se consiguió con CTZ a 16 CMI) (gráfico 1).

De los registros de densidad óptica y recuentos bacterianos concluimos una mayor acción a las 5 h. de exposición sobre la

biomasa y la viabilidad de las cefamicinas versus CTZ, con concentraciones de 0.5-8 CMI. Con respecto a la comparación intragrupo en las cefamicinas cabe resaltar la misma conclusión: mayor actividad sobre estos dos parámetros de CMX en concentraciones de 0-4 CMI. Estas diferencias se hacen mucho más patentes cuando las concentraciones antibióticas se presentan en unidades peso/volumen, ya que se consiguen mayores efectos sobre ambos parámetros con 2 mcg/ml de CMX que con concentraciones mayores de CFX.

Observamos para un recuento de viabilidad determinado, y situado en el rango 4×10^6 y 4×10^8 ufc/ml, una mayor tasa de densidad óptica (biomasa) para la cefalosporina de 3ª generación. Este hecho vuelve a indicar un incremento de la masa por ufc, ante una mayor biomasa para un valor dado de viabilidad, para CTZ.

A concentraciones subinhibitorias, como se observa en la tabla 19, CMX ya ejerce un efecto sobre la biomasa, a diferencia de CFX y CTZ. A concentraciones de la CMI, y tras 2 y 5 horas de exposición, obtenemos densidades ópticas de 10% y 30% para CMX y CFX, respectivamente, con viabilidades de 10^7 ufc/ml para CMX y 10^8 ufc/ml (2 h.) ó 10^7 ufc/ml (5 h.) para CFX, es decir, tras 2 h. de exposición se consigue una reducción del 89% en la biomasa y de 300 veces en la viabilidad con respecto a control para CMX versus el 67% en la biomasa y 10 veces en la viabilidad con respecto a control para CFX. Todo ello parece indicar un mayor efecto de CMX sobre la biomasa, efecto que se mantiene a concentraciones superiores (2, 4 y 8 CMI).

El efecto precoz y más intenso (a concentraciones más bajas) de CMX sobre la biomasa es debido al efecto más precoz sobre la viabilidad (a concentraciones menores), por una parte, y al efecto morfológico (menor densidad óptica para un mismo recuento bacteriano: lisis precoz), por otra.

Como conclusión cabe destacar un efecto lítico mayor que el

control CFX para una misma concentración en términos CMI, a concentraciones peri-CMI (incluso a concentraciones de 0.5 CMI), y una ausencia de filamentación en contraposición al control CTZ.

6. CONSUMO "IN VITRO" DE ANTIBIÓTICO.

El aclaramiento de antibiótico en el foco de infección puede deberse a tres factores: a. farmacocinética (aclaramiento del fármaco por eliminación del mismo del organismo, o por su metabolismo); b. consumo del antibiótico en su acción antibacteriana, antes de la llegada de nuevas cantidades de fármaco por la administración de una nueva dosis; c. susceptibilidad del antibiótico (degradación del mismo) debido a las defensas enzimáticas bacterianas. En este apartado describimos los resultados de b y c.

En el estudio número 12 se evalúa el consumo "in vitro" de CMX frente a cultivos mixtos de E.coli ATCC 25922 y B.fragilis ATCC 25285, versus los cultivos monobacterianos por separado (143), durante 6 horas de exposición al antibiótico. La CMI y la CMB para el cultivo mixto fue de 2 mcg/ml. En el gráfico 6 se observan los consumos a lo largo del tiempo. No hubo inactivación o consumo de antimicrobiano durante las 6 horas de duración del experimento, y las concentraciones se mantuvieron estables para los tres cultivos ensayados (143).

Con respecto a la posibilidad de hidrólisis lenta por betalactamasas cromosómicas, que poseen virtualmente todas las cepas de E.coli, se estudió el efecto de extractos crudos obtenidos por sonicación de E.coli ATCC 25922 y E.coli S31, frente a soluciones acuosas (100 mcg/ml) de los distintos antimicrobianos (141). CTZ fue hidrolizado a las 24 h. AMP y CMX mantuvieron una concentración de aproximadamente el 20% a las 24 h. IMP mantuvo su concentración. Como conclusión cabe destacar que los extractos crudos de betalactamasa de cepas de E.coli sensibles a betalactámicos pueden hidrolizar ciertos

betalactámicos cuando se ensayan a concentraciones altas "in vitro" (141).

La mayoría de las cepas de Bacteroides presentan una actividad cefalosporinasa muy débil, aunque existen cepas capaces de inactivar CFX que han sido encontradas ocasionalmente. Las cepas productoras de cefaminasas son muy poco comunes hoy en día, pero hemos tenido la oportunidad de estudiar la susceptibilidad de CMX vs CFX a las betalactamasas de 8 cepas de este tipo pertenecientes al género Bacteroides (140), en el estudio número 6.

En la tabla 21 se expresa la CMI de CMX y CFX de las 8 cepas de Bacteroides spp, y en el gráfico 7 la degradación enzimática de CMX y CFX. La actividad "in vitro" de ambos antibióticos fue en general similar, aunque CFX fue más activo frente a 4 cepas. La medición de los controles de antibiótico en estado libre reveló una mayor, pero marginal, pérdida de actividad en el caso de CFX tras incubación de 22 h. La degradación de CFX y CMX por los extractos crudos de betalactamasa fue similar y variable dependiendo de la cepa (oscilando entre total a las 5 h. y nula a las 22 h.). Como conclusión cabe destacar la capacidad de hidrólisis de los extractos crudos de cefaminasas producidas por cepas ocasionales de Bacteroides spp (que no sólo son capaces de hidrolizar cefamicinas sino también Carbapenems (152) (160)), y la ausencia de una buena correlación entre la capacidad de los extractos crudos para la hidrólisis de CMX y CFX, por una parte, y los resultados de susceptibilidad "in vitro" expresados como CMI convencional (140).

Integrando los estudios de consumo de CMX, desde el punto de vista microbiológico, cabe concluir una ausencia de inactivación del mismo tras 5 h. de exposición a cultivos monobacterianos y mixtos de las cepas ATCC de E.coli y B.fragilis, pero una inactivación lenta (24 h.) "in vitro" de concentraciones altas de antibiótico tras exposición a extractos crudos de betalactamasas cromosómicas de E.coli, e hidrólisis por

extractos crudos de cefaminasas producidas por cepas ocasionales de Bacteroides spp.

7. ACTIVIDAD "IN VIVO": MODELO ANIMAL DISCRIMINATIVO.

En la tabla 22 se observan los niveles de antibiótico obtenidos con las distintas dosis (73) (72), así como las AUC calculadas a partir de estos datos. En el gráfico 8 se muestran los niveles de los antibiótico CMX, CFX y CTX para las dosificaciones correspondientes a la DE mínima. En la tabla 23 se muestra $t_{1/2}$ (minutos) y unión a proteínas (%) para CMX, CFX y CTX, obtenidos de bibliografía previa (162) (163) (164) (165) (166) (167).

Los efectos farmacodinámicos de CMX, eficacia "in vivo" y su predicción, se estudiaron comparativamente con CFX y CTX, ya que, de los antibióticos estudiados, las cefalosporinas resultaron las más activas (sobre la base peso de la dosis, en este modelo animal con 2 dosis separadas 5 horas) "in vivo", por una parte; forman parte del mismo grupo de fármacos, por otra parte; y, en tercer lugar, se estudió de las tres los aspectos inhibitorios, bactericidas y bacteriolíticos en apartados anteriores.

Como TSA tomaremos la CMI convencional, CMI_{IG} , CMI_{MC} , CMI_{MCIG} y CLM, estudiando, además, la posible relevancia de los efectos inóculo y osmolar "in vivo". Obviamos el estudio de la CMB convencional y CMI_T por presentar valores similares a la CMI convencional y CMI_{MC} , respectivamente, por lo que los valores de los índices farmacodinámicos son asimilables.

7.1. Eficacia "in vivo".

CMX resultó, de forma estadísticamente significativa (al menos $p < 0.05$), más activo "in vivo" que el resto de los antibióticos, ya que con dosis de 0.2 mgrs. se consiguió una

mortalidad de 2.5% para CMX y $\geq 15\%$ para el resto de los antibióticos ensayados.

En la tabla 24 se observa la mortalidad para cada dosis. Observamos que, teniendo en cuenta la variable primaria de eficacia (DE mínima: consecución de mortalidad $\leq 5\%$), CMX resultó, en términos "peso-dosis", 5 veces más activo que CTX, 30 veces más que CFX y CFU, 75 veces más que AMP, 50 veces más que AZT y 1500 veces más activo que PIP. Hay que tener en cuenta que en estos dos últimos antibióticos no se llegó experimentalmente a la dosis definida como mínima efectiva. La actividad "in vivo" comparativa de CMX es mayor que la de los antibióticos control, y la magnitud de esta diferencia es independiente de la presencia de efecto inóculo (5 veces mayor que CTX y 1500 que PIP, fármacos que poseen efecto inóculo) o ausencia del mismo (30 veces mayor que CFX y 75 que AMP).

El número veces que la DE mínima debe superar la CMI es 15 veces inferior para CMX vs CFX (0.2 vs 3), y 165 veces inferior para CMX vs CTX (0.2 vs 33).

La relación DE mínima/TSA para CMX, CFX y CTX, respectivamente, es de 0.2, 3 y 33, en el caso de la CMI, 0.1, 3 y 0.5, para la CMI_{IG} , 0.1, 0.75 y 16, para la CMI_{MC} , y 0.1, 0.75 y 0.5, para la CMI_{MCIG} . Como vemos la eficacia terapéutica "in vivo" está modulada por el efecto inóculo (mayor uniformidad en los índices DE/TSA que utilizan TSAs que tengan en cuenta dicho efecto) y, en menor grado, por el efecto osmolar (mayor uniformidad de la relación DE/TSA al utilizar la CMI_{MC} vs CMI convencional para CMX y CFX, que carecen de efecto inóculo). El mayor grado de uniformidad se consigue cuando la relación DE mínima/TSA se construye a partir del test "in vitro" que tiene en cuenta ambos efectos (CMI_{MCIG} , como prueba estática, o las CLMs, como prueba dinámica a lo largo del tiempo).

7.2. Predicción de eficacia por índices farmacodinámicos estáticos.

Para investigar estas diferencias relacionamos distintos parámetros farmacológicos con los resultados de los diferentes TSA, para la DE mínima, con la finalidad de ver qué relación producía la menor dispersión de valores, ciñéndose mejor a esta definición de eficacia. Para ello, calculamos el tamaño del recorrido de los valores resultantes de cada relación, es decir, la diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo de los distintos antibióticos. En la tabla 25 se observan las relaciones del pico sérico y $1\%AUC$, con cada TSA, tiempo de concentración antibiótica sérica (en la fase beta de eliminación) expresado en unidades $t_{1/2}$ sobre cada TSA (T/TSA), y tiempo interdosis sobre cada TSA (t/TSA). En la tabla 26 se muestran los recorridos para cada relación.

Desde el punto de vista farmacocinético, el parámetro más predictor de eficacia (DE mínima) es t/TSA ya que en todos los casos la dispersión de valores es ≤ 2.8 , con independencia del TSA elegido. En segundo lugar T/TSA es predictivo produciendo dispersiones ≤ 6.4 . Al utilizar el nivel en el pico, o el $1\%AUC$, el grado de dispersión es muy variable y dependiente del TSA escogido (decreciente según se integran en los TSA efectos que hacen variar la susceptibilidad "in vitro"), siguiendo de mayor a menor el siguiente orden: CMI convencional, CMI_{MC} , CMI_{IG} , CMI_{MCIG} y con grados mínimos de dispersión para la CLM. Como vemos, y farmacocinéticamente hablando, disminuye la capacidad de predicción al disminuir el peso específico del factor tiempo en el parámetro farmacocinético escogido; así, es máxima para t y decrece progresivamente con T , $1\%AUC$, para finalizar con pico sérico.

Desde el punto de vista microbiológico, resultan más predictivos los TSA que integran los diversos factores que hacen variar la susceptibilidad "in vitro" (CMI). Así, el mayor grado de predicción lo ostenta la CLM (con un grado de dispersión ≤ 0.8 -

≤ 1.6) y disminuye progresivamente con la CMI_{MCTG} y CMI_{IG} . El grado de predicción de eficacia es mucho menor para los TSA que no toman en cuenta el efecto inóculo (dispersión ≤ 25 con CMI_{MC} y ≤ 205 para CMI convencional), y mucho más dependiente del parámetro farmacocinético escogido (muy baja para los parámetros farmacocinéticos dosis-dependientes -pico sérico y $1\%AUC$ - y mucho más alta para los tiempo-dependientes - t y T -). Observamos, hablando microbiológicamente, que disminuye la capacidad de predicción al disminuir el peso específico del factor "efecto inóculo" (como vemos al relacionar el grado de dispersión de CMI_{IG} con el de CMI) principalmente, y el del "efecto osmolar" (como vemos al comparar el grado de dispersión de CMI_{MC} con el de CMI) secundariamente, sobre el TSA escogido.

Globalmente, las relaciones más predictivas (resultados similares con independencia del antibiótico utilizado, un grado de dispersión ≤ 1) en este modelo de infección intraabdominal monobacteriana (tratado con 2 dosis: 30' y 5 h. postinoculación) son:

a. T/CLM_{30s} : el número de $t_{1/2}$ en beta que el nivel sérico ha de superar la CLM_{30s} es de 3, con independencia del fármaco utilizado.

b. t/CMI_{MCTG} : el tiempo interdosis por encima de la CMI_{MCTG} debe ser ≤ 1 hora para los fármacos estudiados.

c. t/CMI_{IG} : el tiempo interdosis por encima de la CMI_{IG} debe ser ≤ 1.5 horas para las 3 cefalosporinas. La introducción en el TSA del factor osmolar iguala CFX con CMX, al utilizar la CMI_{MCTG} , aumentando el grado de predicción a "b". Con respecto a este factor farmacocinético temporal, el utilizar la CMI_{MCTG} en lugar de la CMI_{IG} disminuye en 1 h. el tiempo necesario que el nivel sérico interdosis debe estar sobre el TSA. Parece que el peso específico farmacodinámico del efecto osmolar "in vitro", es de 1 h. para CFX.

d. pico sérico/ $CLM_{75\%}$: esta relación debe ser de aproximadamente 3 veces para los tres fármacos estudiados, al igual que el $1\%AUC/CLM_{30\%}$.

El resto de las relaciones generan dispersiones superiores a 1, llegando a dispersiones del orden de las decenas con las relaciones de factores farmacocinéticos dosis-dependiente y TSA que no tienen en cuenta el efecto inóculo.

Tomando como referencia estándar la CMI convencional cabe resaltar, desde el punto de vista microbiológico, la gran influencia del efecto inóculo en la eficacia "in vivo", ya que su existencia implica un fuerte aumento del número de veces que el pico sérico (200 veces) o la AUC (10000 veces) deben superar la CMI, o bien del tiempo interdosis que el nivel sérico debe superar la CMI (2.5 veces), o del número de $t_{1/2}$ en la fase beta que el nivel sérico debe superar la CMI (el cual se triplica), del fármaco que presenta efecto inóculo (CTX) en contraste con los que no lo presentan (CFX y CMX), para la consecución de la DE mínima definida.

La influencia sobre la eficacia del efecto osmolar parece mucho más modesta, duplicando la relación pico sérico/CMI, la relación AUC/CMI y el número de $t_{1/2}$ que el nivel sérico (beta) ha de estar sobre la CMI, para el fármaco que presenta efecto osmolar (CFX) en contraste con el que no lo presenta (CMX), en ausencia de efecto inóculo para ambos fármacos, para la consecución de la DE mínima definida.

Hemos visto que desde el punto de vista microbiológico los TSA que tienen en cuenta los efectos inóculo, principalmente, y osmolar, secundariamente, resultan más predictivos que los que no lo tienen, tal es el caso de la CLM, CMI_{MCIG} y CMI_{IG} . La mayor eficacia "in vivo" de CMX (5 veces más activo que CTX y 30 veces más activo que CFX) sobre la base de la magnitud de la dosis mínima efectiva, podría explicarse por la mayor actividad "in vitro" al utilizar estos TSA (0.5, 0.5 y 2 mcg/ml con CMX, 4, 2

y 8 mcg/ml con CFX, y 2, 1 y 2 mcg/ml con CTX, para la $CLM_{75\%}$, $CLM_{30\%}$ y CMI_{MCRG} , respectivamente), con independencia del valor de la CMI, desde el punto de vista microbiológico.

Desde el punto de vista farmacocinético los parámetros tiempo-dependientes (t y T) resultan más predictivos, de ahí la influencia en la actividad "in vivo" de $t_{1/2}$ de CMX (duplicando la de CFX y CTX). La combinación de estos dos factores (microbiológico y farmacocinético) puede explicar la significativamente mayor actividad "in vivo" de CMX con respecto a las cefalosporinas control ante una unión a proteínas similar con respecto a CFX y del 50% con respecto a CTX.

7.3. Dinámica de la modulación (predicción) del efecto (curvas) dosis-respuesta por las distintas relaciones entre factores farmacocinéticos y los tests de susceptibilidad antibiótica.

El modelo animal se diseñó como un estudio de rango de dosificación, es decir, es un modelo dinámico con una relación dosis-respuesta: distintas dosis producen distintas tasas de respuesta dicotómica (mortalidad).

En el gráfico 9a se observa la relación entre el aumento de los picos séricos y su correspondiente disminución de la mortalidad para las dosis estudiadas (con la finalidad de detectar la DE mínima), al aumentar la dosis administrada de los tres antibióticos reseñados (CMX, CFX y CTX). En la tabla 27 se muestran los índices terapéuticos (relación de los niveles séricos en el pico con cada TSA) y su relación con la disminución de la mortalidad; los gráficos 9b a 9g corresponden a esta tabla y se han construido dividiendo los niveles representados en las ordenadas del gráfico 9a por los valores de los distintos TSA (tabla 11). Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) existentes entre CMX o CFX versus CTX al comparar las curvas construidas con los niveles séricos, niveles/CMI y niveles/ CMI_{mc} , desaparecen al utilizar TSA que obvian el efecto inóculo (CMI_{IG} , CMI_{MCRG} y CLM). Exactamente los mismos hechos se

reproducen al utilizar curvas construidas con AUC/TSA (tabla 28, gráfico 10), en lugar de niveles/TSA: desaparecen las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las curvas (aumento AUC/TSA - % decremento de mortalidad) de los fármacos que no presentan efecto inóculo (CMX y CFX) con respecto al que lo presenta (CTX), al utilizar TSA que contemplen dicho efecto.

La situación es similar al construir las curvas de mortalidad con parámetros farmacocinéticos tiempo-dependientes (tablas 29 y 30): T (tiempo en fase beta expresado en unidades $t_{1/2}$ que el nivel debe superar el TSA), en el gráfico 11, y t (tiempo interdosis que el nivel supera el TSA), en el gráfico 12. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) existentes entre los fármacos que presentan efecto inóculo (CTX) y los que no (CMX o CFX) desaparecen al utilizar los TSA que obvian este efecto (CMI_{IG} realizadas con inóculo alto o CLMs). Al utilizar el parámetro farmacocinético T el efecto osmolar se hace más patente, como se ve al comparar los gráficos 11c y 11e: desaparecen las diferencias significativas ($p < 0.05$) existentes al utilizar como parámetro microbiológico la CMI_{IG}, cuando se utiliza la CMI_{MCTG} o la CLM (parámetros que obvian el efecto osmolar).

En el gráfico 12 observamos que t/CLMs resultan los parámetros más predictivos ya que las curvas entre CFX y CTX presentan una práctica identidad. En este caso no se utilizó CMX, al carecer de niveles séricos en todos los puntos de extracción previos al pico sérico (tabla 22).

Con respecto a los parámetros microbiológicos cabe destacar la influencia fundamental del efecto inóculo sobre la variable eficacia terapéutica. El nivel sérico debe superar más veces y durante mayor tiempo la CMI en los fármacos que presentan efecto inóculo, para la consecución de una misma disminución de la mortalidad. El efecto osmolar sólo se hace claramente patente al utilizar parámetros farmacocinéticos tiempo-dependientes: el nivel sérico debe superar durante más tiempo la CMI_{IG} con CFX

(que presenta efecto osmolar) que para CMX (ausencia de efecto osmolar) (gráfico 11c), a pesar de que ambos presentan una CMI_{IC} similar (2 mcg/ml) aunque diferente CMI_{MCTG} (2 versus 8 mcg/ml, para CMX y CFX, respectivamente).

Como conclusión general cabe destacar la gran distorsión que causa en los índices farmacodinámicos (relación parámetro farmacocinético/susceptibilidad "in vitro") como predictores de eficacia, en este modelo animal de infección intraabdominal, el efecto inóculo y, en menor grado, el efecto osmolar. Las curvas dosis-respuesta para los distintos fármacos se pueden comparar cuando los fármacos estudiados se ponen en las mismas condiciones al utilizar relaciones farmacodinámicas que se expresan en unidades de medición relativas (nivel/TSA, AUC/TSA, incremento-T/TSA e incremento-t/TSA), no expresadas en unidades del sistema métrico decimal. Estas relaciones farmacodinámicas resultan más predictivas cuando se utilizan TSAs que tengan en cuenta, principalmente, el efecto inóculo y, secundariamente, el efecto osmolar.

La CLM, además de tener en cuenta los efectos inóculo (se utiliza inóculo alto) y osmolar (se realiza en medio completo), mide la lisis bacteriana que es directamente dependiente del mecanismo de acción del fármaco. En general, este TSA resultó de los más predictivos, aunque dependiente del parámetro farmacocinético elegido, dentro de los índices farmacodinámicos estudiados. Los bajos valores de la CLM para CMX (0.5 CMI vs 2 CMI para CFX y 66 CMI para CTX) podrían explicar su actividad "in vivo" 10 veces mayor que la de CTX y 30 veces mayor que la de CFX, a pesar de presentar una actividad "in vitro" 30 veces inferior a la de CTX y similar a la de CFX, en términos CMI.

8. ENSAYO CLÍNICO FASE I, SIMPLE CIEGO, RANDOMIZADO Y CRUZADO, COMPARANDO 1 Y 2 GRAMOS IV DE CEFMINOX, EN VOLUNTARIOS SANOS.

8.1. Seguridad.

El protocolo del ensayo fue aprobado por el Comité de Ensayos Clínicos del Hospital "La Paz" (Madrid), y fue obtenido por escrito el consentimiento informado de los 6 sujetos antes de su inclusión.

La incidencia, severidad y duración de los efectos adversos se evaluó por entrevista (en los 2 días de estudio y una semana después de la segunda dosis), sin que se detectaran efectos adversos valorables.

8.2. Farmacocinética.

Todos los sujetos completaron el estudio. Las propiedades farmacocinéticas calculadas de los datos HPLC se reseñan en la tabla 31. Las concentraciones séricas se muestran en el gráfico 13.

Las concentraciones de CMX determinadas por HPLC y método microbiológico se correlacionaron bien ($r=0.92$), aunque los niveles determinados por el método microbiológico fueron mayores que cuando eran medidos por HPLC ($y=1.15x + 7.755$).

8.3. Farmacodinamia I. Actividad bactericida sérica.

En este apartado estudiamos la actividad "ex vivo" de CMX tomando como diana la bacteria, así como la predicción de dicha actividad antibacteriana.

Con respecto a los TSA realizados para este estudio, en la tabla 11 se expresan los valores modales de las CMI y CMB, estimadas tras 6 y 24 h. de incubación para cada uno de los microorganismos (Escherichia coli ATCC 25922, Serratia marcescens

ATCC 8100, Klebsiella pneumoniae ATCC 13883 y Bacteroides fragilis ATCC 25285). La relación entre de la CMB a la CMI fue diferente cuando la CMB fue leída a las 6 h. En el caso de E.coli ATCC 25922 y B.fragilis 25285 la CMB_{6h} fue 4 a 8 veces mayor que cuando la lectura se realizó transcurridas 18-24 h. No se encontraron diferencias en las CMIs y las CMBs determinadas con o sin 50% de pool de suero humano, excepto para las CMBs de E.coli que presentaron el valor correspondiente a la dilución anterior en presencia de suero humano. Las correlaciones farmacodinámicas fueron establecidas con las CMIs y CMBs determinadas en ausencia del pool de suero humano.

Los PBS expresados en mediana y rango se muestran en la tabla 32 (A y B). No hubo diferencias significativas en los valores de los PBS tras 6 y 24 h. de incubación. Los PBS de las muestras obtenidas antes de la administración de CMX estaban por debajo del nivel de detección. Aunque la AUC media (obtenida a partir de los niveles determinados por HPLC) de la dosis de 2 grs. era 1.8 veces superior a la de 1 gr. (tabla 31), la correspondiente AUBC media fue de 3.5 a 8.1 veces superior, con independencia de los valores de la CMI y la CMB. En la tabla 33 se muestran las AUBC para las 4 cepas y 2 dosificaciones, expresadas en mediana y rango.

En el gráfico 14 se muestra la correlación significativa obtenida entre las concentraciones plasmáticas de CMX determinadas por HPLC y los PBS para las 4 cepas ensayadas. Correlaciones similares fueron obtenidas cuando se dividía la concentración plasmática por las constantes CMI o CMBs, o cuando se utilizaban las concentraciones determinadas por bioensayo.

En el gráfico 15 los valores de la CMI, CMB y CMB_{6h} , para cada una de las 4 cepas ensayadas, son contrastados con la curva de concentración sérica de CMX. Los PBS medios se muestran para cada rango de concentraciones séricas definidos por las tres mediciones de susceptibilidad "in vitro". Las concentraciones séricas sobre el valor de la CMB_{6h} estaban asociadas más

frecuentemente con PBS significativos (≥ 8) que la CMB convencional o la CMI. De manera similar, concentraciones séricas por debajo de los valores de la CMB_{6h} se asociaban con PBS menores.

En las tablas 34a a 34e se muestran para todas las cepas, aisladamente y en su conjunto, el número y porcentaje de concordancias positivas (muestras séricas con concentraciones por encima del resultado del TSA estudiado -CMI, CMB_{6h} o CMB_{24h}- y PBS ≥ 8), concordancias negativas (muestras séricas con concentraciones por debajo del resultado del TSA estudiado, y PBS < 8), concordancias totales (concordancias positivas más concordancias negativas) y discrepancias (suceso contrario al de concordancia), al considerar todas las muestras tomadas 16 h. tras las dos dosificaciones.

Las concentraciones por encima o por debajo de la CMB_{6h} estaban más frecuentemente asociadas (al menos $p < 0.05$) con PBS ≥ 8 ó < 8 , respectivamente, que las concentraciones por encima o por debajo de la CMI para E.coli (86.9% vs 72.6%) y B.fragilis (86.9% vs 61.9%), o la CMB para S.marcescens (91.6% vs 76.2%) y B.fragilis (86.9% vs 61.9%). Para el conjunto de todas las cepas ensayadas, la asociación fue significativamente mayor ($p < 0.001$) para la CMB_{6h} (85%), que para la CMI (71.8%) o la CMB (72.9%).

Por otra parte, los niveles medios plasmáticos de CMX son mayores que la CMI₉₀ (≤ 0.5 mcg/ml) de las enterobacteriaceas comunes (E.coli, Klebsiella spp, P.mirabilis,...) (tabla 8), al menos 16 h. con la dosis de 2 grs. y 12 h. con la dosis de 1 gr.; la CMI₉₀ de B.fragilis (2 mcg/ml) es sobrepasada por los niveles séricos al menos 12 h. con la dosis de 2 grs. Teniendo en cuenta la tasa de unión a proteínas de CMX (68%) (135) (168), los niveles de antibiótico libre superan la CMI₉₀ de enterobacteriaceas comunes durante 8 y 12 h., y la de B.fragilis durante 6 y 8 h., para las dosificaciones de 1 y 2 gr., respectivamente. Una actividad bactericida sérica adecuada (PBS > 8) se mantuvo durante al menos 4 y 8 h. para las dosificaciones

de 1 y 2 g., respectivamente, frente a las cepas estudiadas.

La actividad antibacteriana sérica ("ex vivo") de CMX fue mayor que la predecible por factores farmacocinéticos (niveles AUC) y por los TSA convencionales. La consecución o no de actividad bactericida sérica adecuada ($PBS \geq 8$) se asocia más a la consecución de una relación nivel sérico/ $CMB_{6h} \geq 1$, por lo que parece que este parámetro es más predictor de la actividad antibacteriana "ex vivo". El uso, como diluyente, del propio suero de cada voluntario (obtenido previo a la infusión de CMX), en la determinación de los PBS, en estado normal (no inactivado por calor) para mantenernos lo más cerca posible de las condiciones "in vivo", puede también explicar la actividad bactericida sérica aumentada en las muestras que contienen elevadas concentraciones de CMX, por lo que se muestra de forma más patente en la dosificación superior.

8.4. Farmacodinamia II. Inmunomodulación.

En este apartado estudiamos la actividad "ex vivo" de CMX tomando como diana los leucocitos polimorfonucleares (PMN), como defensa fisiológica de primera línea a la infección. Asimismo veremos los factores farmacocinéticos que intervienen en la predicción de la actividad inmunomoduladora detectada.

Los PMN se extrajeron previa (como control) y 90 minutos post infusión de CMX. Los niveles plasmáticos medios de CMX (medidos por HPLC) fueron de 56.6 mcg/ml, 37.2 mcg/ml, 28.2 mcg/ml y 22.7 mcg/ml para la dosis de 1 gr., y 117.3 mcg/ml, 68.7 mcg/ml, 52.1 mcg/ml y 42.6 mcg/ml para la dosis de 2 grs., a los tiempos 0 (inmediatamente después de la infusión), 30, 60 y 90 minutos. La curva de concentración plasmática versus tiempo (mg.h./ml. por 1.73 m^2) en estos 90 minutos ($AUC_{0-1.5h}$) fue de 50.8 ± 10.0 para la dosis de 1 gr., y 100.3 ± 12.3 para la dosis de 2 grs.

En la tabla 35 se observa la capacidad de adherencia de los

PMN a superficie plástica y nylon. En la tabla 36 se muestran los índices fagocíticos.

La capacidad de adherencia a superficie plástica y a nylon no quedó afectada después de 90 minutos de la administración de CMX (con cualquiera de las dosis usadas), comparado con los valores control (PMN tomados previamente a su administración).

La administración de CMX no indujo ningún cambio en el número de PMN fagocitantes. El efecto principal de las dosis de 1 gr. y 2 grs. de CMX fue el decremento, versus control, de la eficacia microbicida y el poder microbicida (de un 86% a un 79%, y de un 74% a un 55%, respectiva y aproximadamente), sin que se encontraran diferencias entre las dos dosificaciones. Esto no puede ser atribuido a la pérdida de viabilidad, parámetro que fue >95%. CMX no afectó la fagocitosis con la dosis de 1 gr. pero causó una reducción del 56% con la de 2 grs. Parece aparente en la tabla 36 que los efectos microbicida y sobre la fagocitosis de CMX no están relacionados.

Por otro lado, aunque no se encontraron modificaciones con respecto a la adherencia de levaduras a PMN, entre PMN tratados y controles, la dosis de 2 gr. aumentó este parámetro de adherencia celular en contraste con la de 1 gr. ($p < 0.05$). Aún más, se encontró una relación estadísticamente significativa entre el pico sérico de CMX y el número de levaduras asociadas a PMN ($r = 0.86$, $p < 0.05$) (gráfico 16), y entre la $AUC_{0-1.5h}$ y este índice fagocítico ($r = 0.78$, $p < 0.05$). Lógicamente esto es debido a la correlación entre $AUC_{0-1.5h}$ y la concentración sérica en el pico ($r = 0.98$, $p < 0.05$). No existió correlación entre el número de levaduras asociadas a PMN y la concentración sérica de CMX a los 90 minutos de la infusión.

En conclusión, este estudio muestra que CMX influye sobre la fagocitosis de los PMN. Esta influencia se manifiesta en la capacidad de la adherencia de PMN a las dianas estudiadas (células de C.albicans). La influencia se debe a la acción de CMX

sobre los PMN, ya que CMX carece de actividad patente sobre la diana de los PMN escogida (C.albicans). Esta acción de CMX sobre los PMN sigue una curva dosis-respuesta. Este efecto de inmunomodulación es más predecible por el pico sérico que por el AUC del tiempo de exposición a CMX. La acción inmunomodulatoria de CMX es más "dosis-dependiente" que "tiempo-dependiente".

9. RESUMEN DEL DESARROLLO POSTTOXICOLOGICO Y PRETERAPÉUTICO, Y DE SUS RESULTADOS.

9.A. DESCRIPCION Y PREDICCION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA "IN VITRO".

Diana: E.coli ATCC 25922 excepto cuando se indica lo contrario.

1. Actividad bacteriostática.

1.1. Frente a aislados clínicos, controlada con otras cefamicinas.

- La actividad bacteriostática de CMX es 4 a 16 veces mayor que la de CFX frente a enterobacteriaceas comunes y B.fragilis, no estando influida por la presencia de betalactamasas de amplio espectro, y se mantiene dentro del rango de sensibilidad tras la adición de mecanismos de resistencia de permeabilidad al enzimático citado. CMX, a diferencia de las cefalosporinas de 3ª generación, no es activa frente a los patógenos considerados nosocomiales.

- Esta actividad bacteriostática no se altera tras la adición de otro betalactámico (CTD), y es sinérgica con aminoglucósidos (AMK).

1.2. Influencia de las condiciones de cultivo sobre la CMI de cepas de colección, controlada con cefalosporinas de 2ª y 3ª generación.

- A diferencia de las cefalosporinas de 3ª generación, la CMI de las cefamicinas estudiadas no sufre variación al incrementar el inóculo: ausencia de efecto inóculo ($CMI=CMI_{IG}$).

- A diferencia de CFX y CTX, la CMI de CMX y CTZ no sufre variación al excluir el efecto de la osmolaridad ambiental utilizando medio completo: ausencia de efecto osmolar ($CMI=CMI_{MC}$).

1.3. Actividad inhibitoria comparativa de cepas de colección dependiente de las condiciones de cultivo.

- En términos CMI, CMX presenta una actividad de 8 a 30 veces inferior a las cefalosporinas de 3ª generación y similar a CFX. En términos CMI_{MC} , presenta una actividad 8 veces inferior a las cefalosporinas de 3ª generación y 4 veces superior a CFX. En términos CMI_{IG} , todas las cefalosporinas estudiadas presentan la misma actividad bacteriostática. En términos CMI_{MCTG} , CMX presenta una actividad igual a la de CTX y 4 veces superior a la de CFX.

Sumario de la actividad bacteriostática.

- CMX presenta una actividad bacteriostática superior a CFX, que se asemeja a las cefalosporinas de 3ª generación cuando se tienen en cuenta los efectos inóculo y osmolar.

2. Actividad bactericida. Predicción de la misma.

2.1. Tanto los antibióticos problema como control son bactericidas (CMI similar a CMB).

2.2. Influencia de las condiciones de cultivo sobre la magnitud de la actividad bactericida (medida como descenso significativo del inóculo inicial tras un tiempo de incubación), controlada con cefalosporinas de 2ª y 3ª generación.

- La actividad bactericida está modulada por el efecto inóculo. Los antibióticos que presentan efecto inóculo ejercen una actividad bactericida dependiente del inóculo inicial, a diferencia de los fármacos que no presentan efecto inóculo. Los fármacos que no presentan efecto inóculo ejercen una actividad bactericida significativamente mayor que los que lo presentan, con independencia del inóculo inicial empleado, a concentraciones similares en términos CMI. El efecto inóculo no es concentración o dosis-dependiente (no aumenta la magnitud de la actividad bactericida de forma significativa al incrementar la concentración, a partir de la CMI_{10}).

- La actividad bactericida está modulada por el efecto osmolar. Es significativamente mayor para los fármacos que no presentan este efecto (CMX y CTZ) vs los que sí lo presentan (CFX y CTX). El efecto osmolar es dosis-dependiente (o concentración-dependiente: inversamente proporcional al aumento de concentración): es mayor a concentraciones bajas (peri-CMI). El efecto osmolar es independiente del efecto inóculo y no está influido por la presencia de suero humano.

- El efecto inóculo tiene un peso específico mayor que el efecto osmolar en la modulación de la actividad bactericida, teniendo, además, una influencia directa sobre el tiempo necesario para la consecución de dicha magnitud de actividad bactericida con independencia del inóculo inicial empleado.

- La magnitud de la actividad bactericida está modulada, en el caso de CMX y a diferencia de los fármacos control, por la presencia de suero humano, al menos cuando la diana es B.fragilis. Esta modulación es dosis-dependiente: mayor a concentraciones mayores.

2.3. Predicción de la magnitud de la actividad bactericida.

- Para la consecución de la magnitud de actividad bactericida determinada en cada experimento particular de curvas de muerte bacteriana, resulta más predictiva la CMI_{IG} ante la exclusión del efecto osmolar, y la CMI_{MC} ante la minimización del efecto inóculo.

- La CMI realizada en medio completo y con inóculo grueso (CMI_{MCIG}) es más predictiva de la actividad bactericida que de realizarse en otras condiciones.

Sumario de la actividad bactericida.

- En términos de concentración antibiótica (expresada en múltiplos de CMI o en unidades peso/volumen a partir de 2 mcg/ml -concentración bacteriostática de inóculos altos para los fármacos estudiados-) y con respecto a la capacidad de disminución de la viabilidad bacteriana de inóculos iniciales de 5×10^5 a 10^8 , CMX observa una actividad igual o superior a los fármacos control (con respecto a la magnitud de la actividad bactericida, y el tiempo necesario para conseguirla), ya que no presenta efectos inóculo y osmolar, ante la mayor capacidad predictiva de la actividad bactericida de la CMI_{MCIG} .

3. Actividad bacteriolítica de inóculos altos (10^8 ufc/ml). Predicción de la misma.

3.1. Magnitud de la actividad lítica celular. Controlada con cefalosporinas de 2ª y 3ª generación.

- CMX presenta una mayor actividad lítica sobre inóculos altos, y en términos de concentración (mcg/ml), que los fármacos control: menor CLM con independencia del decremento de densidad óptica tomado como variable de actividad.

- El efecto máximo lítico (densidad óptica) conseguido es del 90% para las cefamicinas y el 75% para las cefalosporinas de 3ª generación, aproximadamente, no incrementándose las disminuciones de densidad óptica al aumentar la concentración. El efecto lítico máximo (tras 20 h. de incubación) no es concentración-dependiente.

- Las concentraciones líticas significativas ($\geq 30\%$), son un efecto (se manifiestan) subinhibitorio para CMX, inhibitorio para CFX y suprainhibitorio para las cefalosporinas de 3ª generación.

3.2. Influencia de las condiciones de cultivo sobre la actividad lítica celular.

- La lisis bacteriana está modulada por el efecto inóculo. A igualdad de concentración en términos CMI, las cefamicinas producen una disminución de la biomasa a lo largo del tiempo significativamente mayor que las cefalosporinas de 3ª generación.

- La lisis bacteriana está modulada por el efecto osmolar. Tanto entre los fármacos que presentan efecto inóculo (CTX y CTZ), como entre los que no lo presentan (CMX y CFX), existen diferencias significativas (ya sea desde el punto de vista de la magnitud de actividad lítica, como el de la concentración, en términos CMI, necesaria para alcanzarla) a favor de los fármacos que no presentan efecto osmolar.

3.3. Predicción de la actividad lítica.

- La aproximación de la concentración antibiótica a niveles de la CMI_{MCTG} es más predictiva de la obtención de decrementos significativos de la biomasa a lo largo del tiempo, o del efecto lítico máximo (decremento de densidad óptica del 90% ó 75% para cefamicinas o cefalosporinas de 3ª generación, respectivamente), que la bacteriostasis determinada en otras condiciones.

- Las diferencias en la determinación de la bacteriostasis

(inóculo y medio) no influyen en la capacidad predictiva de la lisis bacteriana por parte de la CMI, en el caso de CMX y a diferencia de los fármacos control. Esto es debido a que al carecer de efectos inóculo y osmolar CMX presenta valores similares para la CMI determinada en distintas condiciones.

Sumario de la actividad lítica.

- CMX presenta una actividad bacteriolítica, del 30% al 75% de la masa bacteriana, de 2 a 4 veces superior a los fármacos control. A diferencia de éstos, esta actividad de CMX se manifiesta a concentraciones subinhibitorias.

4. Efecto de concentraciones subinhibitorias sobre inóculos estándar.

4.1. CMA. Controlada con cefalosporinas de 2ª y 3ª generación.

- En términos CMA, CMX resulta de 8 a 32 veces menos activo que las cefalosporinas de 3ª generación y 2 veces más activo que CFX.

4.2. Influencia de las condiciones de cultivo sobre el efecto de las concentraciones subinhibitorias. Controlada con CFX.

- Las diferencias significativas de registro de densidad óptica sobre inóculo estándar de CMX y CFX, a concentraciones de 0.5 a 1 CMI, desaparecen al utilizar unidades CMI_{mc} como medida de concentración. Este hecho indica una influencia sinérgica de la osmolaridad ambiental con el efecto antibiótico a concentraciones subinhibitorias en la cinética de crecimiento bacteriano del fármaco que presenta efecto osmolar (CFX).

4.3. Influencia de la relación CMA y efecto inóculo en la actividad lítica de inóculos altos.

- La actividad lítica de inóculos altos comienza a manifestarse (disminuciones de la densidad óptica detectables: $\geq 15\%$) a concentraciones de la CMA para las cefamicinas, y a concentraciones de 15 a 60 veces la CMA para las cefalosporinas de 3ª generación.

Sumario del efecto de las concentraciones subinhibitorias.

- La CMA marca el comienzo para la lisis bacteriana en las cefamicinas (ausencia de efecto inóculo) y no para las cefalosporinas de 3ª generación.

5. Efectos morfológicos celulares sobre inóculos altos.

Control: CFX y CTZ.

5.1. El incremento de la concentración antibiótica, y tras exposición de 2 a 5 h., produce un mayor paralelismo en las disminuciones de biomasa y viabilidad, compatible con la tasa de esferoplastos en la microscopía, para las cefamicinas, en contraste con CTZ.

5.2. El incremento de concentración produce un máximo decremento para la viabilidad y mínimo para la biomasa en el caso del representante de las cefalosporinas de 3ª generación CTZ. Esta dicotomía entre viabilidad y biomasa es compatible con la acción morfológica de filamentación a la microscopía.

5.3. La acción conjunta significativa sobre la viabilidad y la biomasa es más precoz, tanto en términos tiempo de incubación como concentración, para CMX que para los fármacos control. Esta acción conjunta se expresa a concentraciones subinhibitorias (0.5 mcg/ml) para CMX, inhibitorias (2 mcg/ml) para CFX, y

suprainhedoras (1 mcg/ml) para CTZ.

Sumario de los efectos morfológicos celulares.

- La acción celular de las cefamicinas se manifiesta mediante formación de esferoplastos previa a la lisis, siendo ésta más precoz, en términos tiempo y concentración, para CMX vs CFX y sin filamentación previa como CTZ. Estos hechos se corresponden con la cuantificación de las CLMs respectivas.

6. Consumo "in vitro". Hidrólisis enzimática.

6.1. Concentraciones de 50 mcg/ml de CMX son hidrolizadas por extractos crudos de betalactamasas de E.coli ATCC 25922, al 20% de la concentración inicial, tras 24 h.

6.2. Extractos crudos de betalactamasas de cepas esporádicas productoras de cefaminasas pueden producir la hidrólisis total o parcial de 50 mcg/ml de CMX y CFX, tras 5 h. (reducción >80% de la concentración inicial, en 2 de las 8 cepas ensayadas) ó 24 h. (reducción >80% de la concentración inicial, en 4 de las 8 cepas ensayadas) de incubación.

6.3. No existe consumo de CMX (a concentraciones iniciales ≤20 mcg/ml) en cultivos monobacterianos o mixtos de E.coli ATCC 25922 y B.fragilis ATCC 25285, tras 6 h. de incubación.

Sumario del consumo "in vitro".

- A pesar de la hidrólisis "in vitro" de concentraciones altas de CMX tras 24 h. de incubación por extractos crudos de betalactamasas de E.coli ATCC y cepas esporádicas productoras de cefaminasas de B.fragilis, no existe consumo de concentraciones fisiológicas de CMX por cultivos monobacterianos o mixtos de las cepas de colección B.fragilis y E.coli, tras 6 h. de incubación.

SUMARIO DE LA ACTIVIDAD "IN VITRO".

La predicción de la actividad bactericida y lítica de los betalactámicos estudiados es mayor cuando la actividad bacteriostática se determina en medio completo y a partir de inóculo alto. El efecto inóculo y el efecto osmolar modulan la actividad "in vitro". Cuando se tienen en cuenta estos efectos, CMX presenta una actividad bactericida y bacteriolítica superior a los fármacos control, tanto desde el punto de vista de su magnitud como de la concentración y tiempo de exposición necesarios para la consecución de dicha magnitud y del umbral de detección de dicha actividad, frente a E.coli ATCC 25922. En su acción "in vitro", y a concentraciones fisiológicas (en animales), CMX no se consume tras el tiempo de exposición antibiótica (6 h.), a esta cepa.

El espectro de CMX (enterobacteriaceas comunes, B.fragilis, y ausencia de actividad frente a patógenos nosocomiales) lo sitúa como candidato para la infección intraabdominal en modelos animales, donde estudiar la eficacia "in vivo", y su predicción farmacodinámica pre-EC.

9.B. DESCRIPCION Y PREDICCION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA "IN VIVO", CONTROLADA CON CFX y CTX.

1. Descripción de la actividad "in vivo".

- CMX resultó, en términos de DE mínima (dosis en unidades peso, respuesta de consecución de mortalidad $\leq 5\%$), 5 veces más activo que CTX y 30 veces más que CFX, con independencia de su actividad bacteriostática "in vitro" (2 veces más activo que CFX y 30 veces menos activo que CTX).

2. Modulación de la actividad "in vivo".

- La actividad "in vivo" está modulada por el efecto inóculo. CMX (ausencia de efecto inóculo) resulta significativamente más activo que CTX (presencia de efecto inóculo), con independencia de la actividad bacteriostática "in vitro" tras la exclusión del efecto osmolar (16 veces menos activo que CTX al comparar sus respectivas CMI_{MC}).

- La actividad "in vivo" está modulada por el efecto osmolar. CMX (ausencia de efecto osmolar) resulta significativamente más activo que CFX (presencia de efecto osmolar), con independencia de la actividad bacteriostática "in vitro" tras la exclusión del efecto inóculo (idéntica actividad "in vitro" de ambos fármacos, en términos CMI_{IG}).

- La modulación de la actividad "in vivo" por parte del efecto inóculo es mayor que la del efecto osmolar: la relación DE mínima/TSA es más homogénea para los tres fármacos estudiados de utilizar la CMI_{IG} que de utilizar la CMI_{MC} .

- La modulación por ambos efectos equipara la actividad "in vivo" (DE mínima) de los tres fármacos en relación con el TSA. Similar DE/ CMI_{MCIG} para los tres fármacos, con independencia de su actividad bacteriostática convencional "in vitro".

3. Factores microbiológicos en la predicción de la actividad "in vivo".

- Los test que integran los efectos inóculo y osmolar (CMI_{MCIG} , CLM) resultan más predictivos de la eficacia comparativa "in vivo".

- La disminución de la capacidad de predicción es mayor de no tener en cuenta el efecto inóculo, que de no tener en cuenta el efecto osmolar. Significativamente mayor predicción de la

CMI_{IG} que de la CMI_{MC} .

- La capacidad de predicción de los TSA que no obvian el efecto inóculo (TSA realizados con inóculo estándar) presenta una mayor dependencia del factor farmacocinético escogido (mayor predictibilidad de utilizar factores farmacocinéticos tiempo-dependientes, T o t , que dosis-dependientes, AUC o pico sérico).

4. Factores farmacocinéticos en la predicción de la actividad "in vivo".

- Los parámetros farmacocinéticos tiempo-dependientes (t y T) resultan más predictivos de la eficacia comparativa "in vivo".

- La disminución de la capacidad de predicción es mayor de no tener en cuenta el factor tiempo que de no tener en cuenta el factor dosis-nivel: el orden de capacidad de predicción es $t > T > AUC > \text{pico sérico}$.

- La capacidad de predicción de los factores farmacocinéticos dosis-nivel dependientes presenta una dependencia mayor del TSA escogido (mayor con los TSA realizados con inóculo alto).

5. Factores farmacodinámicos en la predicción de la actividad "in vivo".

- Las relaciones de los parámetros farmacocinéticos tiempo-dependientes con los TSA que obvian el efecto inóculo, realizados con inóculo alto, resultan más predictivos de la eficacia "in vivo" que el resto de las relaciones farmacocinéticas.

- Desde un punto de vista farmacodinámico, el efecto inóculo presenta una influencia decisiva en la eficacia terapéutica en el modelo animal, ya que su existencia implica un fuerte aumento

del pico sérico (200 veces) y de la AUC (10000 veces) en relación con la CMI, o del número de $t_{1/2}$ que el nivel sérico debe superar la CMI, en contraste con los fármacos que no presentan este efecto, para la consecución de la DE mínima.

- Desde un punto de vista farmacodinámico, la influencia del efecto osmolar en la eficacia terapéutica es mucho más modesta. El aumento del pico sérico y AUC en relación con la CMI o del número de $t_{1/2}$ que el nivel sérico debe superar la CMI, es sólo de 2 veces, en contraste con los fármacos que no presentan este efecto, para la consecución de la DE mínima.

SUMARIO DE LA ACTIVIDAD "IN VIVO".

La mayor capacidad de predicción de eficacia de los parámetros farmacocinéticos dependientes de $t_{1/2}$, en contraste con los nivel-dependiente, y de los TSA que obvian los efectos inóculo y osmolar, podría explicar la mayor actividad "in vivo" de CMX, que presenta una $t_{1/2}$ en ratas 2 veces mayor que la de los fármacos control, y una actividad "in vitro" similar o superior (de 0 a 4 veces) a los fármacos control, en términos CMI_{MCTG} o CLM.

Desde el punto de vista del laboratorio de microbiología, en este modelo y con estos fármacos, el simple cambio de medios de cultivo (de caldo Mueller-Hinton a medio completo) y de inóculo (de 5×10^5 ufc/ml a 10^8 ufc/ml) en la realización de las pruebas de susceptibilidad antibiótica produciría un aumento significativo en la predicción de eficacia terapéutica.

9.C. DESCRIPCION Y PREDICCION DE LA FARMACOCINETICA Y FARMACODINAMIA EN HUMANOS. EC FASE I.

1. Farmacocinética.

- La C_{max} y AUC son dosis-dependientes: su valor se duplica con la dosis de 1 gr. vs 2 gr.

- Ausencia de saturación del modelo: $t_{1/2}$ (2 h.), V_d y Cl , presentan valores similares para las 2 dosis.

2. Farmacodinamia I: actividad bactericida "ex vivo".

2.1. Descripción.

- Los niveles séricos superan la CMI_{90} de enterobacteriaceas comunes y B.fragilis al menos 12 h. con la dosis de 2 gr.

- PBS adecuados (≥ 8) frente a las cepas de colección ATCC de enterobacteriaceas y B.fragilis, al menos 8 h. tras la administración de la dosis de 2 gr.

2.2. Influencia de las condiciones de laboratorio en la actividad bactericida sérica.

- Efecto sinérgico del antibiótico y suero humano no inactivado. La utilización de una concentración final de suero humano no inactivado (de cada voluntario) del 75% puede explicar la alta actividad bactericida sérica en presencia de concentraciones altas de CMX (primeros puntos de extracción), junto con la posible modulación dosis-nivel dependiente de la actividad bactericida "in vitro" en presencia de suero humano (apartado 9.A.2.2.) y valores de CMB inferiores en presencia de suero humano (versus ausencia) tras 6 y 24 h. de incubación para el E.coli ATCC 25922.

- El tiempo de incubación (6 y 24 h.) en la realización por

el laboratorio del PBS no influyó de manera apreciable en la magnitud de la actividad bactericida sérica (AUBC) frente a las cepas de colección estudiadas.

2.3. Predicción de la actividad bactericida sérica.

- La actividad bactericida sérica (AUBC) fue mayor que la predecible por factores farmacocinéticos (AUC) o microbiológicos (TSA convencionales: CMI o CMB) habituales.

- Niveles séricos superiores o inferiores a la CMB_{6h} resultan más predictivos de PBS adecuados o inadecuados respectivamente, que de utilizar TSA convencionales (CMI o CMB).

Sumario de la actividad bactericida sérica.

CMX cubre las enterobacteriaceas comunes al menos 12 h. tras la administración de 2 gr., desde el punto de vista de los niveles séricos, con una actividad bactericida sérica mayor que la predecible por los TSA convencionales durante las primeras 8 h.

3. Farmacodinamia II: inmunomodulación.

Diana: Candida albicans.

3.1. Descripción.

- CMX no afecta la capacidad de adherencia a superficies de los PMN, ni el número de células fagocitantes.

- CMX disminuye vs control la eficacia frente a C.albicans.

- La dosis de 2 gr., vs 1 gr., incrementa la adherencia de levaduras a PMN.

3.2. Predicción.

- El efecto inmunomodulador de adherencia de PMN a sus dianas (levaduras) se correlaciona con el pico sérico y la AUC_{0-1.5h} (de la primera hora y media), pero no con el nivel sérico a la 1.5 h. de la administración.

Sumario de la inmunomodulación "ex vivo".

A diferencia del efecto antibacteriano tiempo-dependiente "in vitro" e "in vivo" (modelo animal), el efecto inmunomodulador "ex vivo" de CMX sobre los PMN es nivel-dependiente y no tiempo-dependiente.

SUMARIO DEL EC FASE I.

En las indicaciones para CMX dadas por la actividad bacteriostática "in vitro" (Sumario de la Actividad "in vitro"), y probada su eficacia terapéutica comparativa en modelo animal para estas indicaciones (Sumario de la Actividad "in vivo"), CMX se debe estudiar en EC a dosificación de 2 gr. cada 12 h. en infecciones intraabdominales focalizadas, o cada 8 h. en infecciones intraabdominales con riesgo de sepsis, en base a la magnitud temporal de cobertura antibacteriana (tiempo de los niveles por encima de la CMI), en el primer caso, y además magnitud y duración de actividad bactericida sérica adecuada, en el segundo.

V. DISCUSSION

Comenzamos la discusión de esta tesis desde dos puntos de vista:

A. predicción de eficacia terapéutica, a demostrar en los futuros EC.

B. grado de adhesión de los estudios realizados en España (entre 1989 y 1991), en el desarrollo posttoxicológico y preterapéutico de CMX, a las nuevas Recomendaciones de Evaluación de Fármacos Antiinfectivos de la FDA/IDSA (1992). Las recomendaciones del desarrollo preclínico están recogidas en el capítulo de Recomendaciones Generales para Bacteriología Clínica (169), así como en el de Recomendaciones Generales para Evaluación de Fármacos Antiinfectivos (170). Nos referiremos siempre a las recomendaciones de la FDA/IDSA, ya que las europeas, editadas en 1993 (171), son modificaciones de las de la FDA/IDSA en la mayoría de sus capítulos y, en concreto, no sufren variaciones con respecto a los datos utilizados en este trabajo, por una parte, y carecen del capítulo correspondiente a las recomendaciones para bacteriología clínica, por otra.

La distinción entre estos dos aspectos, técnicos o de normas de desarrollo de fármacos, nos parece banal ya que, en ambos casos, se llega a un esquema de dosificación (para cada patología), al que habrá que atribuir una alta probabilidad de eficacia terapéutica (y baja probabilidad de efectos adversos) en contraste con los otros esquemas posibles, a evaluar en futuros EC. Así, los conceptos actividad "in vitro", actividad "in vivo" y farmacocinética, necesarios para el estudio biológico de la predicción de eficacia, quedan reflejados uno a uno en los conceptos estudios microbiológicos, modelos animales y EC Fase I, recogidos en las Recomendaciones para el Desarrollo de Antimicrobianos (169).

Los intervalos de dosificación conseguidos pueden variar, desde el punto de vista de desarrollo de fármacos, por la ausencia de recomendaciones a las que adherirse y por existir

unos estándares comunitarios de uso de antimicrobianos distintos con respecto a las dosificaciones habituales de los fármacos control. Este es el caso de CMX, que se desarrolló en Japón con distintos estándares de desarrollo (debido a la época en que se realizaron los estudios) y con distintos fármacos control (debido a los estándares comunitarios). Por ello, en el desarrollo previo de CMX se concluyeron diferentes esquemas de dosificación a ensayar en patologías distintas a las que se proponen a lo largo de esta tesis.

Tanto la predicción de eficacia como los requerimientos del desarrollo giran en torno a tres conceptos: espectro, actividad (tanto "in vitro" como "in vivo") y farmacocinética humana. El problema reside en interrelacionar adecuadamente los distintos conceptos a partir de los distintos estudios elegidos para concluir una administración supuestamente adecuada del fármaco.

Una de las mayores diferencias entre las enfermedades infecciosas y otras enfermedades es que en las primeras la causa de la enfermedad puede ser aislada del paciente (172), contraponiéndose los agentes antimicrobianos con otros fármacos (170) en los siguientes aspectos: a. predicción razonable de la eficacia potencial a partir de los resultados de los TSA en conjunto con el modo de acción, farmacocinética y farmacodinámica; b. la concentración del fármaco puede ser medida en fluidos biológicos a lo largo del tiempo; y c. estos fármacos son capaces de prevenir la invasión, inhibir el crecimiento o erradicar el agente etiológico; aunque los pacientes tratados con estos fármacos pueden ser vulnerables a enfermedades infecciosas adicionales por otros agentes etiológicos (sobreinfección) o los iniciales que adquieren resistencia (pudiendo transmitirse a personas no infectadas).

Como vemos, la relación fármaco-agente etiológico es fundamental y puede y debe ser estudiada en ausencia del paciente.

Sin muchas pruebas experimentales, existe la convicción de que la utilidad terapéutica de un antibiótico puede ser calculada a partir de su eficacia "in vitro" y la farmacocinética en humanos. Cabe añadir que la experiencia clínica nos dice que esta convicción puede ser cierta (172).

Muchos años han pasado antes de la generación de datos convincentes que indicasen que distintos antibióticos requieren diferentes esquemas de dosificación para el éxito del tratamiento en pacientes graves infectados (173), esquemas de dosificación que son obtenidos de la información de la susceptibilidad antimicrobiana "in vitro" y modelos animales (170) junto con los datos farmacocinéticos iniciales (170).

En la discusión de esta tesis comentamos los distintos aspectos (predictivos/recomendaciones) del desarrollo de CMX: actividad "in vitro"/estudios microbiológicos, actividad "in vivo"/modelos animales, y farmacocinética/EC Fase I, para concluir en la elección de las patologías donde evaluar los esquemas de dosificación obtenidos, en futuros EC fases II y III con unas características que determinaremos.

1. ACTIVIDAD "IN VITRO"/ESTUDIOS MICROBIOLÓGICOS.

Aunque parece razonable esperar una correlación entre la CMI y la eficacia terapéutica, no lo es relacionar directamente esta prueba "in vitro" con la eficacia "in vivo" (172). Aparte de que el valor de esta determinación "in vitro" es dependiente de las condiciones de laboratorio en que se realiza la prueba (tales como inóculo inicial utilizado o medio de cultivo empleado), parece que una prueba leída por efecto óptico tras 18 a 24 h. de incubación puede estar influida por los hechos farmacodinámicos que acontezcan en la primera parte de este periodo, obteniéndose así valores de lectura idénticos para distintos antibióticos con distintos microorganismos (172). No sabemos la importancia de estos efectos farmacodinámicos iniciales, si tenemos en cuenta

la farmacocinética del antibiótico y el intervalo de dosificación utilizado. Por ello, otros parámetros "in vitro" han sido utilizados, tales como la CMA (174), pero, para diferentes binomios antibiótico-bacteria, la relación CMI/CMA varía, indicando que no se deben interpretar los datos farmacocinéticos utilizando sólo la CMI (172) con respecto a la predicción de eficacia o/y al establecimiento de esquemas de dosificación.

Debido en parte a estos hechos, los objetivos de los estudios preclínicos "in vitro", con respecto a la variable eficacia, quedan enumerados en las Recomendaciones FDA/IDSA (170) y europeas (171) de la siguiente forma: a. demostrar la actividad antiinfectiva "in vitro" frente a microorganismos diana; b. examinar las condiciones de cultivo que puedan afectar la actividad antimicrobiana; c. determinar las interacciones con otros antimicrobianos; y d. suministrar información sobre el mecanismo de acción y el potencial de desarrollo de resistencias. Así, los aspectos microbiológicos a estudiar en los estudios preclínicos (169) son: espectro y efecto inóculo, resistencia y resistencia cruzada, actividad bactericida y mecanismo de acción. Estos estudios "in vitro" se complementan con el efecto de concentraciones subinhibitorias, efecto postantibiótico e interacciones con otros antimicrobianos recogidas en las recomendaciones generales (170). El efecto inóculo lo discutiremos, debido a su implicación, principalmente en los apartados sobre actividad bactericida y mecanismo de acción; englobaremos en un mismo apartado los distintos requerimientos sobre resistencia; y sólo mencionaremos someramente el efecto postantibiótico y las interacciones con otros antimicrobianos, debido a la importancia relativamente menor de estos aspectos en el caso de los betalactámicos.

A continuación veremos estos aspectos de los estudios microbiológicos.

1.1. Espectro.

A pesar del objetivo de identificar compuestos con CMI más bajas frente patógenos de importancia clínica, en contraste con antibióticos ya utilizados en la práctica diaria, no existe la garantía de que los antibióticos con bajos valores en este parámetro puedan controlar exitosamente las infecciones bacterianas (175). Debido a que la CMI de un antibiótico para un microorganismo dado y los niveles séricos alcanzados por el fármaco son fáciles de medir, estas concentraciones han sido la base sobre la cual han sido construidos los esquemas de dosificación, en la suposición de que la ecuación "CMI-concentración sanguínea" parece reflejar actividad biológica (176). Sin embargo, ya revisamos adecuadamente los problemas en la capacidad de predicción de eficacia de este parámetro en la Introducción a esta Tesis, resaltando los concernientes al medio de cultivo, tasas de muerte a distintos tiempos, tiempos de incubación (no encajan con la cinética "in vivo"), inactivación de los fármacos (durante la inadecuada incubación), inóculos y fases de crecimiento inadecuados y, desde el punto de vista farmacocinético y con respecto a la parte "niveles séricos" de la ecuación, son ignorados los efectos de la unión a proteínas y las concentraciones subinhibitorias, a la vez que estas concentraciones no reflejan la distribución del fármaco ante la ausencia de significación cinética de un único nivel (176).

La menor capacidad de predicción de la categoría de susceptibilidad "sensible" (15) indica que un valor bajo de la CMI solamente expresa una cierta probabilidad de que el antibiótico pueda controlar la infección, considerándose, pues, este parámetro microbiológico de susceptibilidad, un indicador útil e importante para seleccionar los antibióticos para tratar infecciones (175), es decir, definitorio de espectro. Los estudios basados en la CMI deben ser utilizados de forma primaria para identificar cepas resistentes, y sólo secundariamente como indicadores de la eficacia de un antibiótico determinado (175).

Por ello, y de acuerdo con las recomendaciones, el espectro de actividad se debe determinar mediante este test frente a más de 500 cepas de aislados clínicos de rutina, con un número apropiado de especies relevantes y cepas parcialmente resistentes (169), comparativamente con fármacos habituales aprobados (especialmente, los del mismo grupo de antimicrobianos) (170).

Si clasificamos los microorganismos según su posible significación etiológica, obtendremos dos grupos dependiendo del lugar de adquisición de la infección: nosocomiales y comunitarios; y, de forma general, cuatro grupos mayores dependiendo de la localización de la infección: urinaria, respiratoria, gastrointestinal e intraabdominal. CMX no es activo frente a patógenos nosocomiales. Dentro de las infecciones comunitarias, no parece muy adecuado frente a patología urinaria y gastrointestinal, debido a que la única forma galénica es la parenteral IV. Con respecto a la patología respiratoria adquirida en la comunidad, presenta cierta actividad frente a los estreptococos y *H. influenzae*, pero superada ampliamente por las cefalosporinas de 3ª generación y desapareciendo en el caso de penicilin resistencia para los neumococos. Claramente no es un fármaco anti-estafilocócico.

Su actividad, tras la criba microbiológica, queda centrada de forma general frente a los agentes etiológicos de la infección intraabdominal. En este campo, presenta una actividad frente a enterobacteriaceas comunes ($CMI_{90} \leq 0.5$ mcg/ml) 4 a 16 veces superior a CFX, y con respecto a *B. fragilis* ($CMI_{90} = 2$ mcg/ml) 4 a 16 veces superior a CFX y CTT (137), cefamicinas habitualmente utilizadas en este tipo de infecciones. Las cefalosporinas de 3ª generación son más activas frente a las enterobacteriaceas comunes pero menos frente a *B. fragilis*, y la clindamicina y el metronidazol necesitan de aminoglucósido para el tratamiento de las infecciones intraabdominales de frecuente etiología mixta. Parece que, desde el punto de vista microbiológico, los valores de la CMI para CMX y frente a estos patógenos, indican una probabilidad de controlar la infección, según esta acepción de

CMI (175) y la consecuente aplicación en la definición del espectro. El desarrollo del fármaco ha de dirigirse hacia la consecución de esquemas de tratamiento y profilaxis de las distintas infecciones intraabdominales, que deberán mostrar su eficacia en futuros EC. Desde el punto de vista explicativo, se habrá de evaluar la predicción de eficacia de la susceptibilidad "in vitro" en modelos "in vivo" (modelos animales) adecuados para este tipo de patología, y exigidos o recomendados en las guías editadas de desarrollo de antibióticos a utilizar en el tratamiento y prevención de infecciones intraabdominales (177) (178).

En la determinación de las CMI, el efecto del tamaño del inóculo bacteriano y la osmolaridad ambiental deben ser estudiados (170), y debe considerarse la realización de estos tests con suero humano (170). El estudio del efecto inóculo es requerido específicamente en las recomendaciones generales para bacteriología clínica, con respecto a los estudios preclínicos (169), comparativamente con antibióticos comercializados y seleccionados dentro del mismo grupo antibiótico (169).

Diversos estudios avalan que el aumento significativo en la CMI al aumentar el inóculo sobre el que se realiza el TSA, puede tener significación terapéutica (72) (179) (180). Frente a las cepas de colección ATCC estudiadas, comparativamente con fármacos del mismo grupo, CMX no presenta efecto inóculo, como las cefamicinas y a diferencia de las cefalosporinas de 3ª generación. Con respecto a la influencia de la osmolaridad ambiental, estudiada comparativamente con fármacos del mismo grupo, CMX y CTZ no presentan variación de la CMI al utilizar medio estándar o completo, a diferencia de CFX y CTX. Asimismo, concentraciones de 10 al 50% de suero humano no afectan el resultado de la CMI determinada en condiciones estándar (medio Mueller-Hinton, 37°C e incubación de 18-24 h.).

Antes hemos visto la definición del espectro de CMX a partir de la CMI. Al estudiar el término actividad observamos que ésta sufre variaciones cuando varían las condiciones del medio. Así, en términos de actividad, las diferencias existentes entre los fármacos estudiados desaparecen al enfrentar los antibióticos a un inóculo alto, más fisiológico (más parecido a los existentes "in vivo" en infección intraabdominal). Si suprimimos la acción conjunta de la osmolaridad del medio con la acción propia del antibiótico, desaparece la actividad inhibitoria similar para las cefamicinas, ya que la osmolaridad ambiental actúa sobre los inóculos bacterianos sinérgicamente en el caso de CFX pero no de CMX. Estos dos efectos, osmolar e inóculo, tienen una influencia decisiva sobre la eficacia "in vitro" de los antibióticos, medida en términos de actividad inhibitoria, ya que, si se tienen en cuenta, CMX presenta una actividad similar a CTX y superior a CFX, mientras que si no se tienen en cuenta su actividad es muy inferior a la de CTX y similar a la de CFX, frente a E.coli ATCC 25922. Esta cepa fue escogida para utilizarse después en el modelo animal, al igual que en los subsiguientes TSA estudiados con el fin de investigar la predicción de la variación de las condiciones de laboratorio en la eficacia terapéutica.

Con el estudio de la CMI, hemos definido el espectro de CMX, y las variaciones que, sobre el crecimiento bacteriano, ejercitan las condiciones de cultivo, tal como requieren las recomendaciones editadas (170). Siguiendo con el estudio de este TSA, entramos en el capítulo del estudio de resistencias.

1.2. Resistencia.

El efecto letal de los antibióticos es tan fuerte que sólo las bacterias resistentes sobrevivirán. Podemos aceptarlo como consecuencia, usualmente transitoria, del tratamiento. Pero otros usos inapropiados de los antibióticos, concretamente la elección inadecuada del antibiótico o del tiempo de su aplicación, exacerban el problema de la resistencia.

Levy S B (1992). Antibiotic Resistance: A Societal Issue at Local, National, and International Levels. In: The Antibiotic Paradox (How Miracle Drugs Are Destroying the Miracle). Levy S B. Plenum Press, Plenum Pub.Co., New York.

La mortalidad, la hospitalización, y la duración de la misma, fueron al menos el doble en los pacientes infectados por cepas resistentes vs los infectados por cepas sensibles de la misma bacteria.

Holmberg S D; Solomon S L and Blake P A (1987). Health and Economic Impacts of Antimicrobial Resistance. Rev. Infect. Dis. 9:1065-1078.

Para el establecimiento de los "breakpoints" de susceptibilidad "in vitro" aplicamos la sofisticada fórmula del grupo de trabajo de la BSAC (25), considerando además que el número de veces que el nivel sérico debe superar a la CMI es de 2 a 10 (181) (ó de 4 a 10 (74)); esta aproximación nos permite establecer 2 "breakpoints": alto y bajo (181). Para aplicar esta fórmula necesitamos datos del Fase I realizado: C_{max} y $t_{1/2}$, datos que discutiremos posteriormente, pero cuyos valores son de aproximadamente 120 mcg/ml y 2 h. respectivamente, para la dosificación de 2gr. Además, necesitamos conocer el % de unión a proteínas: 68% (135).

Aplicando la fórmula reseñada en el apartado 1.2.3. de la Introducción y deslizando el valor al más próximo en la escala de diluciones que contenga la número 1, obtenemos unos valores para los "breakpoints" de 64 mcg/ml y entre 8 y 16 mcg/ml (el resultado de la fórmula es 12), para necesidades de superación de la CMI, por parte del nivel sérico, de 2 y 10 veces, respectivamente.

Con estos "breakpoints", y con respecto a los aislados ensayados en el estudio comparativo de actividad frente a aislados bacteriémicos (137), el 100% de las cepas de los géneros

Escherichia, Klebsiella, Proteus, Providencia y Bacteroides resultaron sensibles de utilizar el "breakpoint" alto (64 mcg/ml).

Veremos más adelante, en el modelo animal, que el número de veces que la C_{max} debe superar la CMI es de aproximadamente 2 para el caso de CMX, por lo que, a priori, parece correcto utilizar el "breakpoint" de 64 mcg/ml. Sin embargo, y a pesar de que los modelos animales son requeridos como parte de una aplicación IND (Investigational New Drug) (170), el resultado de los modelos animales en el diseño de estudios Fase II (diseño de regímenes y determinación de los intervalos de dosificación) (170) no puede ser extrapolado directamente al uso en humanos (EC) debido a las diferencias mayores existentes entre humanos y animales (170). Por ello e inicialmente en el desarrollo preclínico, aunque los "breakpoints" tentativos se seleccionan a partir de las relaciones de la CMI y farmacocinética (en las fases iniciales del desarrollo, I y II) (182) para ser utilizados (modificados y definitivamente fijados) en las fases II y III, parece lógico utilizar como "breakpoint" el valor más bajo (16 mcg/ml, similar a otros fármacos del mismo grupo) que es el correspondiente a la necesidad de que la C_{max} supere en 10 veces la CMI.

Utilizando este "breakpoint" el 100% de las enterobacteriaceas antes citadas resultan susceptibles y, al menos el 90% de las cepas pertenecientes al género Bacteroides, ya sean especie fragilis o grupo fragilis, ya que la CMI_{90} para estas cepas es de 2 mcg/ml y 16 mcg/ml, respectivamente.

Con esta tasa de resistencias, a partir del establecimiento del "breakpoint" elegido con los criterios del BSAC más rigurosos, parece lógico, otra vez, situar CMX como candidato a EC Fases II y III en terapéutica y profilaxis de infecciones intraabdominales, de forma general.

A pesar de que no existe necesidad de identificar los mecanismos de resistencia antes de empezar los EC (169), es recomendado estudiar la aparición de resistencia (sometiendo a inóculos altos a altas concentraciones antibióticas) (170). En los estudios preclínicos de actividad antimicrobiana por dilución ha de medirse la resistencia cruzada con antibióticos de la misma familia, aprobados y representativos en la comunidad (usados en indicaciones similares a las que se intenta conseguir) (169), o pertenecientes a otro grupo (170) y usados en estas indicaciones (en nuestro caso, infecciones intraabdominales). La muestra ensayada debe incluir cohortes seleccionadas de cepas (169), además de los aislados clínicos representativos, de forma que, en vez de determinar la CMI a miles de bacterias resistentes, el uso de mutantes isogénicas con mecanismos de resistencia bien definidos puede obviar el tiempo de laboratorio (28). Por último, se debe estudiar la estabilidad de la actividad antimicrobiana frente a cepas representativas de las especies apropiadas (169), con respecto a la patología en la que el fármaco se pretende ensayar.

Con respecto a la aparición de resistencia, no se detecta sobre la base del método citado, utilizando E.coli ATCC en los experimentos correspondientes a los estudios números 4 y 5, con inóculo alto y altas concentraciones antibióticas (≥ 4 mcg/ml), en que los recuentos bacterianos están por debajo del límite de detección tras 20 h. de incubación.

Los datos del estudio número 1 (Informe Final y Póster presentado en el XXX ICAAC, correspondiente a la cita 137) indican una ausencia de resistencia cruzada para los géneros Escherichia, Klebsiella y Proteus, ya que todos los aislamientos clínicos fueron sensibles a los antibióticos estudiados y muy por debajo del "breakpoint" de susceptibilidad. Menos del 10% de los aislados clínicos de E.coli resultaron resistentes a CFX y sensibles a CMX y CTT. En el estudio número 10 el 50% de las cepas de Bacteroides grupo fragilis resistentes a CFX son sensibles a CMX, sin embargo, el 34% de las cepas de Bacteroides

grupo fragilis resultaron resistentes a ambos antibióticos (tomando para ambos un "breakpoint" de 16 mcg/ml), a pesar de la actividad de CMX frente a B.thetaiotaomicron resistentes a otras cefalosporinas (128). Sí existe en nuestra comunidad una fuerte identidad en la resistencia de CMX y clindamicina (22%) a los mismos aislamientos de Bacteroides grupo fragilis (con un "breakpoint" de 8 mcg/ml para clindamicina el 36% de las cepas resultaron resistentes a este fármaco). No se detectaron aislamientos resistentes, ni resistencia cruzada con metronidazol.

CMX fue más activo que CFX frente a cepas de enterobacteriaceas portadoras de las nuevas betalactamasas de amplio espectro (137), aumentando la CMI de estas cepas en sus isogénicas OmpF mutantes, de 2 a 4 veces (137) y dentro del rango de sensibilidad. Parece, pues, que CMX no presenta resistencia cruzada con fármacos del mismo grupo, frente a las enterobacteriaceas comúnmente implicadas en la infección intraabdominal, y que el porcentaje de susceptibilidad no decrece ante la aparición de los dos mecanismos de resistencia citados. Sin embargo, la tasa de resistencia cruzada de Bacteroides grupo fragilis con CFX se sitúa en un 34% y en un 22% para clindamicina.

Las tasas de resistencia cruzada para B.fragilis, principal anaerobio implicado en patología quirúrgica intraabdominal, son muy inferiores (<10%) a las del Bacteroides grupo fragilis, ya que el rango de CMI es de 0.5 a 64 y 2 a 32 mcg/ml para CMX y CFX, respectivamente, con una CMI₉₀ de 2 y 16 para ambos antibióticos, respectivamente (tomado del Póster presentado en el XXXII ICAAC y correspondiente a la cita 137).

Por último, y con respecto a la estabilidad en la actividad biológica de CMX, vemos la posibilidad del decremento de la misma por extractos crudos de betalactamasas de E.coli ATCC 25922 (141) o de cepas de Bacteroides fragilis productoras de cefaminasas (140). CMX y CFX tienen una susceptibilidad similar a los

extractos crudos de estas cepas de Bacteroides, sugiriendo una completa resistencia cruzada entre estas cepas productoras de cefaminasas (140). Las cepas de Bacteroides productoras de cefaminasas son aislamientos esporádicos, aunque ha de esperarse su aumento de incrementarse la utilización de cefamicinas (140), quizá dependiendo también de dosis e intervalos de dosificación inadecuados, ya que el factor clave es el tiempo de incubación y sólo 2 de los extractos (cepas) de los 8 ensayados produjeron una reducción significativa tras 5 h. de incubación. Con respecto al E.coli ATCC 25922, el decremento hasta una actividad del 20% se produjo tras 24 h. de incubación. Por ello, parece lógico el resultado del estudio número 12 donde se demuestra la estabilidad de CMX, tanto frente a cultivos puros de E.coli como de B.fragilis y la asociación de ambos (143), tras 6 h. de incubación. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros autores (183) con mayor número de cepas de B.fragilis.

El tiempo de incubación en el estudio de consumo citado y realizado en nuestro país (número 12, (143)) es importante ya que es superior al intervalo de dosificación que utilizamos en el modelo animal, por lo que los resultados de éste no podrían atribuirse teóricamente a una inactivación enzimática por la cepa de E.coli ATCC 25922. Por otra parte, con CFX se observa, en otros estudios (128), una inactivación a lo largo del tiempo, por cultivos mixtos E.coli-B.fragilis, inactivación que es mucho mayor en el caso de CTX (143), fácilmente inactivado por la betalactamasa del anaerobio que impide su acción frente a E.coli. Por lo que parece que sólo cefalosporinas como CMX y cefmetazol parecen tener actividad y estabilidad frente a cultivos mixtos (143).

Desde el punto de vista del estudio comparativo de las resistencias, parece que CMX presenta tasas de susceptibilidad próximas al 100% para los principales patógenos responsables de la infección intraabdominal, enterobacteriaceas comunes y B.fragilis, que, en el 80% de los casos, es adquirida en la comunidad (177), donde todavía se debate la necesidad de

cobertura de *Enterococcus faecalis* (CMX presenta unas CMI_{50} y CMI_{90} de 32 y 64 mcg/ml, respectivamente, a este germen, con un rango de 32 a 64 mcg/ml: Informe final del estudio número 1 y póster correspondiente a la cita 137). La relevancia de la resistencia cruzada es relativa por afectar fundamentalmente a Bacteroides del grupo fragilis, aunque el aumento del uso de las cefamicinas, de forma inadecuada (con respecto a dosificación o indicación), puede incrementar la prevalencia, de las actualmente esporádicas, cepas de B.fragilis productoras de cefaminasas. Frente a cepas control representantes de las cepas actuales, en cultivos mixtos, CMX mantiene su actividad un tiempo superior al intervalo de dosificación utilizado en el modelo animal de infección intraabdominal, y próximo, como veremos, al intervalo de dosificación que deduciremos para EC en este tipo de infecciones en pacientes graves.

1.3. Actividad bactericida.

La pérdida de viabilidad es expresada como la proporción de inóculo transformado en no viable a lo largo del tiempo. En esta prueba se informa de la actividad de una concentración fija a lo largo de intervalos de tiempo, que deben ser escogidos para cuantificar la velocidad o persistencia del efecto bactericida (170). Aunque estos tests no necesitan preceder los estudios clínicos de un nuevo antibiótico, los datos microbiológicos obtenidos antes de que el antibiótico sea aprobado para los primeros EC deben incluir información general sobre la actividad bactericida frente a cepas apropiadas, por métodos estandarizados (184) y en paralelo con antibióticos del mismo grupo aprobados para su uso (169).

A lo largo del desarrollo preterapéutico de CMX hemos estudiado comparativamente su actividad bactericida frente a cepas control, prototipo de los agentes etiológicos de patología mixta intraabdominal: E.coli ATCC 25922 y B.fragilis ATCC 25285. En distintos estudios los inóculos sobre los que se estudia la acción antibiótica han variado desde 5×10^5 ufc/ml a 10^8 ufc/ml,

con puntos de recuento bacteriano a las 0, 1.5, 3, 6 y 24 h., y utilizando medios de cultivo estándar (Mueller-Hinton), fisiológico (medio completo para excluir el posible sinergismo con la osmolaridad ambiental) y Mueller-Hinton con suero humano (para estudiar el posible sinergismo del antibiótico con el suero humano).

La mayoría de los estudios tienen como diana al E.coli ATCC 25922 ya que sería utilizado como germen infectante en el modelo animal, por lo cual podríamos relacionar el peso específico de cada uno de estos factores en la predicción de eficacia terapéutica en el modelo, aunque la relevancia de los tests rutinarios de la actividad bactericida "in vitro" como guía de manejo clínico no es clara (169). Así, no existe garantía de que antibióticos con la CMB bajas puedan controlar exitosamente las infecciones bacterianas (175), indicando que la CMB, como la CMI, deben ser usadas primeramente para identificar cepas resistentes y, sólo en segundo lugar, para indicar la efectividad (probabilidad de eficacia) de un antibiótico (175).

CMX, al igual que los fármacos control, resulta bactericida a las 24 h. (CMB similar, no mayor de una dilución, a la CMI).

Dejando aparte esta prueba "in vitro" estática, de escaso valor predictivo, estudiamos curvas de muerte bacteriana, donde nos aproximaremos al problema incubando el inóculo por un período similar al del intervalo de dosificación utilizado en el modelo animal. Los distintos puntos de recuento bacteriano nos dan la velocidad de acción bactericida. Este hecho quizás sea más predictivo ya que los fármacos que inhiben preferentemente la PBP3 presentan efecto inóculo (138) y son bacteriostáticos de forma muy lenta y bactericidas de forma aún más lenta (181). Si existe una relación entre actividad bactericida y efecto inóculo, y el efecto inóculo es un factor que modula la predicción de eficacia (72) (185), puede ser que esta forma de medición de la actividad bactericida sea más predictiva de actividad "in vivo".

En los estudios llevados a cabo hemos observado la modulación de la actividad bactericida por el efecto inóculo: los fármacos que no presentan efecto inóculo ejercen una actividad bactericida significativamente mayor que los fármacos que sí lo presentan, con independencia del inóculo inicial empleado. La expresión actividad bactericida es referida aquí tanto en términos de magnitud de descenso de inóculo inicial como de velocidad para conseguir dicho descenso (descensos significativos, ≥ 2.3 log, del inóculo inicial estándar o alto se consiguen a las 3 h. para las cefamicinas y a partir de las 6 h. para las cefalosporinas de 3ª generación).

Por otra parte, la actividad bactericida está modulada por el efecto sinérgico de la osmolaridad del medio. Así, CFX y CTX aumentan su CMI al utilizar medio completo que excluye el efecto de la osmolaridad del medio. Pues bien, estos fármacos producen un decremento del inóculo inicial (5×10^6 ufc/ml) de 100 a 1000 veces dependiendo de la concentración (efecto osmolar concentración dependiente) y a diferencia significativa de los fármacos que no presentan efecto osmolar los cuales producen decremento del orden de 10000 veces con independencia de la concentración ensayada (concentraciones fisiológicas en ratas: 2, 4 y 8 mcg/ml).

En el modelo animal, que discutiremos posteriormente, el inóculo de E.coli ATCC 25922 es alto (10^8) y la segunda dosis de antibiótico se administra a las 5 h. El mayor descenso de inóculos iniciales altos para una misma concentración, y la consecución de dicho descenso en un intervalo inferior al tiempo de administración de la segunda dosis, de CMX vs CTX, y el mayor descenso vs CFX que produce sobre el inóculo inicial cuando se excluye la osmolaridad del medio, sí podrían tener valor predictivo de eficacia en el modelo animal.

Otros autores (127) con diferente metodología sugieren que CMX es más bactericida que lo predecible por la CMI, y encuentran una buena correlación entre la actividad "in vivo" y la CMB,

especialmente cuando se determina tras 6 h. de incubación.

Cuando tenemos en cuenta el efecto del suero humano sobre la actividad bactericida observamos la disminución de la CMB tras 6 y 24 h. de incubación en presencia de 50% de suero humano frente a E.coli ATCC 25922 (estudio número 15). Parece que existe un sinergismo entre el suero y el antibiótico problema, CMX. Por otra parte, y utilizando curvas de muerte bacteriana, el efecto sinérgico con 10% de suero humano se detectó frente a B.fragilis de forma creciente según se incrementaba la concentración antibiótica hasta hacerse significativo a concentraciones de 8 mcg/ml. La acción bactericida es dependiente de la concentración antibiótica y de la dilución sérica (186), postulándose la posible existencia de componentes ultrafiltrables séricos que aumenten la actividad de las cefalosporinas frente a bacilos gram negativos (99). Nuestros resultados coinciden con los de otros autores (187) donde la actividad bactericida "in vitro" de CMX (tras un corto período de exposición, 2 h.) se veía aumentada en presencia de suero no tratado de ratón (normal y neutropénico), de forma más evidente que los fármacos control y frente a cepas de enterobacteriaceas. Las actividades bactericidas determinadas así en este trabajo se correlacionaban bien con la actividad "in vivo" en ratones inmunocomprometidos (187).

La ausencia de efecto inóculo y efecto osmolar, y el efecto del suero humano, podría inicialmente ayudar a explicar la mayor actividad "in vivo" de CMX vs fármacos control, descrita en otros estudios (127) (132). Sin embargo, a la hora de predicción de eficacia los resultados de las curvas de muerte bacteriana son difíciles de incluir en una ecuación actividad "in vitro"-farmacocinética. Por ello, parece más lógico estudiar la influencia de la actividad bactericida "in vitro" en la eficacia "in vivo" de forma indirecta, observando la predicción de la actividad bactericida a partir de la actividad bacteriostática. La relación, de existir, podría trasladarse a la actividad "in vivo", ya que el dato puntual de actividad bacteriostática es incluible de forma más fácil en la ecuación TSA-parámetro

farmacocinético.

De los experimentos de actividad bactericida concluimos, en el apartado de Resultados, que para la consecución de una magnitud de actividad bactericida determinada es necesario alcanzar la CMI realizada en medio completo, ante la exclusión del efecto inóculo, o la CMI realizada sobre un inóculo alto, ante la exclusión del efecto osmolar. Por ello, parece más predictiva de la actividad bactericida, medida como decremento de la viabilidad bacteriana (a los tiempos determinados, inferiores a las 6 h.), la CMI realizada con inóculo alto y en un medio completo. En el apartado de actividad bacteriostática comentamos la mayor actividad de CMX vs CFX en términos CMI_{MCIG} y por otra parte hemos visto la consecución más rápida de actividad bactericida significativa para fármacos sin efecto inóculo (CMX vs CTX). De resultar más predictiva de eficacia terapéutica la CMI_{MCIG} que la CMI convencional, la actividad bactericida "in vitro" tendría una intervención directa en la actividad "in vivo".

1.4. Mecanismo de acción.

Hemos comentado con anterioridad la relación existente entre efecto inóculo, actividad bactericida y mecanismo de acción (diana, PBP, de los fármacos estudiados). La tercera cara del problema es la lisis bacteriana (actividad lítica) versus efectos morfológicos celulares, como expresión del mecanismo de acción. Al existir una relación entre mecanismo de acción y efecto inóculo (138), como hemos visto, y una relación, también, entre este parámetro y la actividad bactericida (181), el mecanismo de acción tendría una acción directa sobre la actividad "in vivo", ante la implicación de la actividad bactericida en esta actividad "in vivo" (187), ya comentada en el apartado C de esta discusión. La veracidad de este desarrollo lógico implicaría una relación tridimensional entre efecto inóculo, actividad bactericida y actividad bacteriolítica, introduciendo el concepto de biomasa (masa bacteriana).

En un modelo animal para el estudio de la actividad "in vivo" hay que distinguir los factores bacterianos que contribuyen directamente a la virulencia bacteriana (morfología bacteriana, tasa de crecimiento y productos metabólicos, como toxinas y enzimas degradantes de antibióticos), de los factores defensivos del huésped, y la presencia de productos exógenos (antibióticos) (188).

Es por esto que el concepto de biomasa adquiere importancia, ya que la virulencia es definida como masa bacteriana capaz de producir daño (cuantificable como mortalidad) a un huésped determinado (189).

Los efectos diferentes de los antibióticos betalactámicos, frente a bacilos gram negativos, dependen de las afinidades relativas por las distintas PBP (190). La mayoría de las células de E.coli presentan una longitud de 3 μm (191) y un peso de 3.67×10^{-9} mg (188). Cuando ocurre un alargamiento hasta tamaños $>10 \mu\text{m}$ la célula se denomina filamento, resultante de la multiplicación sin septación a células individuales, por lo cual el filamento contiene numerosos genomas. En contraste con la muerte bacteriana (lisis), el filamento tiene el potencial de reasumir una tasa normal de crecimiento 2 h. (188) después de la desaparición del antibiótico. Este hecho puede tener importancia "in vivo" ante la caída de las concentraciones antibióticas por debajo de la CMI antes de la administración de la siguiente dosis.

Desde un punto de vista pragmático parece lógico pensar que el efecto óptimo antibacteriano es la lisis celular en vez de la filamentación, ante la posibilidad de crecimiento posterior, en este último caso, y aunque los filamentos sean más susceptibles a la acción bactericida de los PMN que las unidades bacterianas normales (192). Así, en el modelo animal podría influir este hecho, ya que para conseguir una disminución de la mortalidad $\geq 95\%$, el tiempo que el antibiótico sérico debe superar la CMI es de aproximadamente 1.5 h. para las cefamicinas y superior a 4 h.

para CTX. Como hemos visto, la acción de las cefamicinas es lítica de inóculos densos (del mismo tamaño que los utilizados en el modelo animal), a concentraciones muy inferiores, en términos CMI, a las cefalosporinas de 3ª generación (138), correlacionándose bien con los cambios morfológicos (esferoplastos y lisis en las cefalosporinas de 2ª generación vs filamentos en las de 3ª generación, a estas concentraciones (138)).

Parece, nuevamente, que este efecto lítico influye sobre la actividad "in vivo" desde un punto de vista temporal, ante la necesidad de superar la CMI un tiempo más próximo a la segunda dosis con las cefalosporinas de 3ª generación, necesitándose la administración de esta segunda dosis antes de que los filamentos puedan asumir una tasa normal de crecimiento (2 h. después de la caída del antibiótico por debajo de la CMI). Otra vez el efecto inóculo aparece como protagonista al igualarse los tiempos que el nivel debe superar la CMI cuando ésta se realiza con inóculo alto. La importancia de la lisis bacteriana queda reflejada ante la similitud del número de veces que la concentración sérica debe superar la concentración necesaria para lisar el 75% de la masa bacteriana (aproximadamente 3 veces), o el número de horas que el nivel sérico debe superar dicha concentración, para la obtención de una mortalidad $\leq 5\%$, para las cefamicinas y CTX. La marcada actividad bactericida de CMX (138), relacionada con su actividad lítica de la biomasa (reflejo de sus efectos morfológicos celulares), en contraste con los fármacos control (CMX presenta valores inferiores de CLM), parecen explicar, desde el punto de vista microbiológico (excluyendo ahora los factores farmacocinéticos), su actividad "in vivo".

En presencia de antibióticos, el desarrollo morfológico de un bacilo depende de la estructura química de los antibióticos, su concentración en el medio, tiempo de exposición, especie expuesta y técnica usada (188). La CLM, determinada en las condiciones en que se han realizado los experimentos turbidimétricos (medio completo, inóculo alto), integra los

efectos inóculo y osmolar, así como los derivados del mecanismo de acción. Hemos visto una dicotomía entre la viabilidad y la biomasa para las cefalosporinas de 3ª generación, al incrementar la concentración antibiótica, compatible con la acción morfológica de filamentación en la microscopía. Muchas cefamicinas tienen fuerte actividad antimicrobiana, sin embargo, las similares a las cefalosporinas de 3ª generación (moxalactam) tienen escaso efecto lítico temprano tras la adición del antibiótico (190), a diferencia de CMX que también, en la experiencia de otros autores, muestra una acción bacteriolítica mucho mayor de forma rápida tras la adición antibiótica (190). CFX muestra un modo de acción intermedio entre CMX y moxalactam (190). La notable actividad lítica de los compuestos betalactámicos en cuya estructura se presenta un D-aminoácido, puede ser entendida por su unión a determinadas PBP (dianas líticas como en el caso de otras cefamicinas, PBP 1a/1b), junto con la unión del terminal D-amino al péptidoglicano, probablemente inhibiendo la unión de este péptidoglicano a la lipoproteína (126) (193).

1.5. Efecto de concentraciones subinhibitorias.

Se ha necesitado un término para definir la concentración mínima de antibiótico que afectase la estructura bacteriana sin variar significativamente la viabilidad bacteriana (174). Como siempre, y más cuando se estudia la predicción de eficacia, el problema reside en el término "significativamente". Lorian define la CMA como la concentración que causa un efecto inhibitorio que es observado en 5.5 h., en las cuales el 90% de la población bacteriana es inhibida, por una parte, y que causa alteraciones morfológicas o estructurales en la bacteria, por otra (194) (195).

Atendiendo a esta definición, y desde un punto de vista turbidimétrico, observamos (Gráfico 5 izq) una inhibición de la biomasa bacteriana inicial correspondiente a un inóculo estándar durante más de 6 h. (superior al intervalo entre las dos dosis

en el modelo animal) con 0.5 mcg/ml de CMX, 2 mcg/ml de CFX y 0.03 mcg/ml de CTX; concentraciones subinhibitorias para CMX e inhibitorias para CFX y CTX.

Las recomendaciones generales para la evaluación clínica de antimicrobianos definen (170) concentraciones subinhibitorias como aquellas concentraciones por debajo de la CMI que ejercen efectos biológicos distintos a la prevención del crecimiento microbiano. Desde el punto de vista de la CMA (en los experimentos turbidimétricos realizados sobre inóculo estándar) con respecto al control (0.5 y 1 mcg/ml para CMX y CFX, respectivamente), este parámetro marca la concentración a partir de la cual es detectable la actividad lítica de inóculos altos de las cefamicinas, mientras que este hecho ocurre a concentraciones de 15 a 60 veces en las cefalosporinas de 3ª generación. Por ello, una acción conjunta sobre la biomasa y la viabilidad (de inóculos iniciales altos) se expresa a concentraciones subinhibitorias para CMX (0.5 mcg/ml), inhibitorias para CFX (2 mcg/ml) y suprainhibitorias para las cefalosporinas de 3ª generación. Es menor la dicotomía entre biomasa y viabilidad con CMX en contraste con los fármacos control.

Así, las concentraciones séricas interdosis correspondientes a la DE mínima en el modelo animal, superan de 2 a 3 h. la CMA de las cefamicinas y un tiempo superior a las 5 h. para CTX.

Aunque los efectos morfológicos han sido reconocidos primeramente "in vitro", también han sido observados cambios estructurales similares en muestras clínicas de pacientes que recibían terapia antibiótica (196).

Se ha discutido en apartados anteriores la influencia de la actividad lítica antibiótica sobre la eficacia "in vivo" que, en términos predictivos, en los resultados del modelo animal se plasmaba en las relaciones de los parámetros farmacocinéticos temporales con las CLM. Cabe preguntarse, ante la influencia de

la lisis bacteriana en la eficacia "in vivo", si el comienzo precoz (en términos tiempo y/o concentración) de dicha actividad lítica influiría también sobre dicha actividad "in vivo".

Hemos estudiado dos parámetros farmacocinéticos temporales en el modelo animal: t (tiempo de antibiótico interdosis) y T (tiempo de antibiótico medido sólo a partir del pico). Desde un punto de vista dinámico, t representa el ascenso de concentraciones desde 0 (y concentraciones subinhibitorias) hasta el pico sérico (que contempla concentraciones suprainhibitorias) y T representa el descenso de concentraciones suprainhibitorias a lo largo del tiempo desde el pico sérico hasta concentraciones subinhibitorias.

En el modelo animal realizado, y desde un punto de vista dinámico del efecto dosis-respuesta (apartado 7.3 de los Resultados), parece que existe una capacidad de predicción similar, de eficacia "in vivo", al relacionar t o T con las CLM, al menos con CFX y CTX (ya que no se estudió la curva dosis-respuesta para t /TSA con CMX). Este hecho también ocurre cuando se evalúan de forma estática las relaciones t o T con CLM (Tabla 25); en este caso parece existir incluso una mayor capacidad predictiva de T/CLM_{30s} (2.6-2.9, con independencia del fármaco), que t/CLM_{30s} (que presenta una mayor dispersión de valores, rango 1.5-2.6, para los fármacos estudiados). Con los datos que disponemos (predicción similar para T -tiempo de concentración a partir del pico- o t -tiempo de concentración total interdosis- en relación con la CLM) no parece que la precocidad en la acción lítica tenga un efecto (en contraste con los otros efectos estudiados, tales como el efecto inóculo) cuantificable de forma patente sobre la eficacia "in vivo" en el modelo animal no inmunocomprometido de sepsis intraabdominal descrito.

En este modelo animal la primera dosis se administró 30 min. después de un inóculo alto bacteriano. Este tiempo es igual al periodo ventana de CMX. A pesar de que CMX pertenece al grupo de fármacos activos al menos en las fases iniciales del desarrollo

de la tolerancia fenotípica (59), es decir, activos frente a bacterias con tiempos amplios de generación (cultivos con bajas tasas de crecimiento, similares a las que ocurren "in vivo"), se situó a los tres fármacos, CMX, CFX y CTX, en situación similar, no pudiendo atribuirse los resultados a la posible omisión de la tolerancia fenotípica por parte de CMX, ya que se administró tras el periodo ventana. Sin embargo, desde un punto de vista conceptual, parece que fármacos activos en las fases iniciales del desarrollo de la tolerancia fenotípica (tasas bajas de crecimiento por privación de nutrientes, o inóculos densos), o que presenten una actividad lítica (de inóculos densos) precoz y/o a concentraciones bajas, son importantes en el tratamiento de infecciones que requieren optimización de los efectos bactericidas (59), ante la evidencia en contra de la relación de destrucción bacteriana rápida y respuesta adversa al tratamiento (197) por liberación de endotoxina (198).

Otros autores (190) han encontrado también una actividad mucho más bacteriolítica de CMX, tanto desde el punto de vista temporal (rápidamente tras la adición del antibiótico), como desde el punto de vista de concentración antibiótica (ocurre a concentraciones subinhibitorias).

1.6. Efecto postantibiótico.

El hecho de que CMX suprimiera la proliferación bacteriana, incluso cuando las concentraciones antibióticas caían por debajo de la CMI, sugería (129) un efecto postantibiótico similar al observado con IMP y aminoglicósidos (129), pero no las cefamicinas y otras cefalosporinas (199).

Las recomendaciones para bacteriología clínica (169) recomiendan la valoración del efecto postantibiótico (aunque no como un estándar sobre el que los "breakpoints" o las recomendaciones de dosificación sean deducidos), ante una discrepancia de los resultados "in vitro"/"in vivo", o bien como parte de los estudios de laboratorio adicionales requeridos para

la valoración de cambios en la dosificación y/o resolución de aspectos discrepantes en las bases de datos en desarrollo.

En los resultados de los estudios "in vitro" (apartado 2.5. de los Resultados) observamos que CMX no presenta PAE valorables, a concentraciones alcanzables "in vivo", tanto frente a cultivos monobacterianos como frente a cultivos mixtos.

Estos resultados "in vitro" son comunes a los antibióticos betalactámicos (200), donde el PAE es pequeño, nulo o, incluso, negativo a concentraciones cercanas a la CMI (109) (150). Sin embargo, en otros estudios (201), el tiempo requerido para que una cepa de Klebsiella pneumoniae se multiplicase al nivel de recuento bacteriano previo a la dilución del antibiótico fue de 12 h. (tiempo de incubación bacteria-antibiótico: 2 h.), y el tiempo requerido "in vivo" (modelo animal: inoculación intraperitoneal en ratones de 10^6 ufc/ml de la misma cepa y tratados 2 h. después con 12.5 mg/Kg de CMX) para alcanzar los recuentos bacterianos antes del tratamiento antibiótico fue de 14 h. (201).

A pesar de estos resultados discrepantes, probablemente debidos a distintas metodologías y a la atribución de los efectos "in vivo" a distintas explicaciones de observaciones "in vitro", no parece lógico introducir en una ecuación actividad "in vitro"-farmacocinética, cuyo objetivo es la predicción de eficacia y el establecimiento de esquemas de dosificación, el PAE de un betalactámico, que por su espectro va dirigido a infecciones intraabdominales muchas veces de etiología mixta.

1.7. Interacciones con otros antimicrobianos.

Debido a la posibilidad del doble mecanismo de acción de CMX (PBP, lipoproteína), parece tentador explorar el sinergismo de CMX, no sólo con antibióticos aminoglicósidos, sino también con antibióticos betalactámicos para aunar la actividad lítica incrementada de CMX con una ampliación de espectro atribuible al

otro antibiótico.

En los estudios realizados observamos un sinergismo claro con AMK y una indiferencia con CTD. En otros trabajos (202), y utilizando métodos turbidimétricos, no se observó el antagonismo de la combinación con ciertos antibióticos betalactámicos (203) (204), atribuible a la inducción de betalactamasas (aspecto aún por estudiar y cuantificar para CMX). En estos trabajos se observó un aumento de la actividad bacteriolítica tras el pretratamiento durante 1 h. con PIP, seguido del tratamiento combinado con CMX, atribuido al incremento en la penetración de CMX tras la filamentación inducida por PIP. La situación inversa (pretratamiento con CMX) resultó en indiferencia.

Nuevamente, ante estos resultados probablemente dependientes de factores metodológicos, no parece lógico, a partir de los datos obtenidos "in vitro" en el desarrollo de CMX, plantear combinaciones dobles de betalactámicos en los futuros EC de un antibiótico cuyo espectro lo dirige a la infección intraabdominal (etiología mixta), ante la falta de predicción de la categoría sinergismo y la predicción de la categoría antagonismo en un análisis crítico a que debe someterse cualquier combinación de un nuevo antibiótico (43).

2. ACTIVIDAD "IN VIVO". MODELOS ANIMALES.

Desde un punto de vista pragmático, los modelos animales de eficacia, como parte de la información necesaria de un nuevo antibiótico antes de la realización de EC en, se requieren, de forma previa al desarrollo clínico de un fármaco, para el tratamiento de infecciones intraabdominales (177), pero no para el tratamiento de enfermedad pélvica inflamatoria (205). Antes de EC en profilaxis de cirugía colorectal el fármaco debe haber demostrado eficacia en el tratamiento de la infección intraabdominal (178).

Desde un punto de vista explicativo, las recomendaciones generales para bacteriología clínica (169) establecen claramente tres aspectos:

- a. los modelos animales de infección deben ser usados para tests de inóculos seleccionados, y diseñados como estudios dosis-respuesta para establecer la eficacia "in vivo".
- b. si los resultados preliminares de la infección experimental muestran una discrepancia significativa en la predicción de la eficacia "in vivo" sobre la base de la eficacia "in vitro", debe estudiarse el origen de dicha discrepancia.
- c. es necesario un método adecuado de la predicción de la eficacia "in vivo" antes de iniciar ECs.

Debido a estos hechos el modelo animal estudiado en esta tesis es de infección intraabdominal (condición pragmática) y monobacteriano (condición explicativa).

2.1. Modelo animal de eficacia. Estudio dosis-respuesta.

CMX resultó significativamente más activo "in vivo" que los fármacos control (CFX y CTX), tanto desde el punto de vista de la dosis necesaria para conseguir un decremento de mortalidad $\geq 95\%$ (30 veces más activo que CFX y 5 veces más que CTX), de la mortalidad obtenida con una dosis de 0.2 mg (mortalidad del 2.5% para CMX y $>15\%$ para los fármacos control), como desde el punto de vista del número de veces que D.E. mínima definida debe superar la CMI (15 veces más activo que CFX y 165 veces más que CTX).

2.2. Estudio de la discrepancia "in vivo"/"in vitro".

Evidentemente existe una discrepancia entre la actividad "in vitro" e "in vivo". "In vitro" CMX resulta, en términos CMI, 2 veces menos activo que CFX y 30 veces menos que CTX.

A lo largo de esta discusión hemos comentado factores

relevantes que pueden influir, o influyen, sobre la actividad "in vivo", tanto a partir de los estudios objeto de esta tesis, como de los realizados por otros autores. De forma básica, parte de la discusión se ha centrado en la trilogía actividad bactericida (viabilidad), actividad bacteriolítica (biomasa) y efecto inóculos. Estas tres facetas de una misma situación tienen influencia en la eficacia "in vivo", y son dependientes, en última instancia, del mecanismo de acción del fármaco. Estos factores microbiológicos "in vitro" favorecen a CMX: ausencia de efecto inóculo, principalmente, pero también mayor (en términos de necesidad de menor concentración) actividad bactericida (tanto desde el punto de vista de la magnitud conseguida como del tiempo necesario para alcanzarla), actividad lítica (tanto desde el punto de vista de la concentración a que comienza a ejercerse como de la magnitud conseguida) y ausencia de decremento de actividad al suprimir el efecto de la osmolaridad ambiental.

Estos factores "in vitro", comentados con anterioridad a lo largo de esta tesis, pueden explicar en parte la dicotomía "in vivo"/"in vitro" ya que no existe una uniformidad en los resultados de la relación D.E.mínima/TSA (0.2, 3 y 33, en el caso de CMI; 0.1, 0.75 y 16, en el caso de CMI_{MC}; 0.1, 3 y 0.5, en el caso de CMI_{IG}; y 0.1, 0.75 y 0.5, en el caso de CMI_{MCIG}; para CMX, CFX y CTX, respectivamente). Observamos dos hechos: la eficacia "in vivo" (en términos de D.E.) está modulada básicamente por el efecto inóculo ya que los TSA que integran dicho efecto deben ser superados un menor número de veces por la D.E., equiparando, fundamentalmente, CMX y CTX. En segundo lugar, y con menor relevancia, el efecto osmolar equipara CMX, CFX y CTX, cuando se integra conjuntamente con el efecto inóculo en un TSA. La mayor uniformidad se consigue con la CMI_{MCIG}.

Otros factores que, desde el punto de vista farmacodinámico "in vitro", pueden influir conceptualmente la eficacia "in vivo" son la ausencia de consumo de antibiótico (CMX) en concentraciones fisiológicas por parte de la cepa infectante (E.coli ATCC 25922) durante un tiempo superior al intervalo

interdosis, y el posible efecto sinérgico del suero en lagomorfos (187), compatible, como veremos al discutir las pruebas "ex vivo" del EC fase I, con el efecto sinérgico del suero humano.

Sin embargo, desde un punto de vista farmacocinético, podría contribuir a esta eficacia "in vivo", tanto el valor de $t_{1/2}$ de CMX en ratas (que es el doble que el de los fármacos control), como una unión a proteínas del 50% con respecto a CTX. Así, CMX presenta una curva farmacocinética sérica, correspondiente a la D.E. mínima, más plana y prolongada que los fármacos control (Gráfico 8). Este hecho es importante ya que para antibióticos con curvas de concentración sérica con formas diferentes, la potencia "in vivo" varía de su valor "in vitro" (172); así, una curva de concentración más plana y prolongada (en el caso de los betalactámicos) parece estar asociada con una mayor actividad "in vivo" (172).

Intentando asociar ambos factores (farmacocinéticos e "in vitro") observamos que al construir curvas dosis-respuesta con factores farmacocinéticos tiempo-dependientes (tiempo de manutención de niveles interdosis o a partir del pico) y TSA que integren el mayor número de factores microbiológicos estudiados (efecto inóculo, efecto osmolar, mecanismo de acción morfológico celular) que modulan el resultado del TSA, se obtiene una similitud entre los tres fármacos sin diferencias significativas. Las diferencias se manifiestan al utilizar factores farmacocinéticos dosis-dependientes (nivel sérico en el pico y AUC) o TSA que no integren los factores microbiológicos moduladores citados.

2.3. Método de predicción de eficacia.

La extrapolación de eficacia de un modelo animal a humanos siempre es un hecho complicado, y más cuando se efectúa en el desarrollo preterapéutico de un antibiótico. En el caso de los tres fármacos que nos ocupan, el problema para la extrapolación radica fundamentalmente en el factor determinado por $t_{1/2}$. Si

tenemos en cuenta la fórmula para el establecimiento de los "breakpoints" (25), y el peso específico numérico de cada uno de los factores que integran dicha ecuación, observamos que el factor "f" (que representa la unión a proteínas) es similar, en humanos y roedores, para los tres antibióticos estudiados. Pero este hecho no ocurre con el factor $t_{1/2}$, muy diferente en lagomorfos y humanos. El factor que escenifica $t_{1/2}$ sería 2, en el caso del modelo animal, y 1, en el caso de los humanos. El valor de los "breakpoints" (cuyo objetivo es la predicción de eficacia) sería la mitad, en el caso del modelo animal en comparación con los humanos. Pero debido a que la CMI_{90} (que describimos en el apartado actividad inhibitoria/espectro) de CMX frente a los agentes etiológicos de infección intraabdominal está muy por debajo de los "breakpoints" calculados con los dos factores "t" (para humanos o roedores), el modelo parece, en principio, extrapolable (no desde el punto de vista de la eficacia, sino desde el de predicción de la misma).

En cualquier caso, se requiere el modelo animal comparativo (con fármacos que sean estándar comunitario, y del mismo grupo), en términos dosis-respuesta, por la condición pragmática de modelos animales en el desarrollo de antimicrobianos.

Cualquier sistema de predicción de eficacia tiene que incluir términos en la ecuación farmacocinética-susceptibilidad "in vitro", que sean fácilmente obtenibles desde el laboratorio o, en su defecto y en algunos casos de parámetros farmacocinéticos, de la bibliografía. Por ello, la predicción de eficacia se basa fundamentalmente en parámetros obtenidos en el laboratorio de microbiología frente a la cepa aislada.

Hemos estudiado cuatro parámetros farmacocinéticos (nivel en el pico, AUC, t y T) y cuatro parámetros microbiológicos fácilmente obtenibles por parte del laboratorio (CMI , CMI_{MC} , CMI_{IG} y CMI_{MCIG}). Las combinaciones de ambos tipos de parámetros en la ecuación farmacocinética-TSA, que producen una mayor predicción de eficacia, son fáciles de deducir a raíz de lo comentado en el

apartado 2.b de esta Discusión: discrepancia de los resultados "in vivo"/"in vitro".

Tanto desde un punto de vista estático como dinámico, las relaciones de los factores farmacocinéticos temporales con la CMI_{MIC} resultan más predictores de eficacia. Desde un punto de vista estático, el grado de dispersión del tiempo interdosis "t" (o tiempo "T", expresado en $t_{1/2}$, a partir del pico sérico) de la concentración antibiótica sobre la CMI_{MIC} , es menor que al utilizar otros TSA y parámetros farmacocinéticos, con los tres antibióticos estudiados. Desde un punto de vista dinámico (curvas dosis-respuesta), las diferencias estadísticamente significativas existentes en los tests que utilizan inóculos bajos o/y medio Mueller-Hinton desaparecen al utilizar inóculos altos y medios que obvian el efecto de la osmolaridad ambiental, con independencia del parámetro farmacocinético escogido.

Otros autores han encontrado que la susceptibilidad "in vitro" de inóculos altos es buena predictora de eficacia en modelos animales (185), al igual que el tiempo en que las concentraciones de estos betalactámicos exceden la CMI, otra vez, de forma relacionada con el inóculo (181).

Parece claro que con los betalactámicos los parámetros farmacocinéticos dosis-dependientes (nivel y AUC) son menos predictivos de eficacia que los tiempo-dependientes (t y T). Los parámetros tiempo-dependientes están directamente relacionados con el parámetro farmacocinético $t_{1/2}$, constante ante la ausencia de alteraciones fisiológicas que influyan en el metabolismo o aclaramiento del antibiótico.

Desde un punto de vista microbiológico, el simple hecho de realizar la prueba "in vitro" con un inóculo alto (obviando la importante modulación de la actividad "in vivo" por el efecto inóculo) y la utilización de un medio completo (que obviaría el efecto osmolar que diferencia las cefamicinas) aumentaría la predicción de eficacia terapéutica de forma patente de este

modelo animal monobacteriano de infección intraabdominal, con los tres antibióticos betalactámicos estudiados.

Hay que ser cauteloso en la extrapolación de la afirmación anterior a otras situaciones (modelos, patologías y fármacos), ante la estandarización de las condiciones de determinación de la CMI por parte de grupos como el NCCLS (195). Sin embargo, nunca hay que olvidar que estas estandarizaciones, esencialmente correctas, eliminan la consideración de efectos como el inóculo o el osmolar (195). Nunca ha sido establecido un inóculo terapéuticamente equivalente, y los efectos de este parámetro han sido atribuidos usualmente a la aparición de variantes resistentes, destrucción patente del fármaco o accesibilidad insuficiente del mismo (195). En cualquier caso, parece que este efecto inóculo tiene influencia en la actividad bactericida y bacteriolítica y, por ende, en la actividad "in vivo", como hemos visto a lo largo de esta tesis. Por ello, no es de extrañar la ausencia de predicción de eficacia de la CMI, categoría susceptible, ya que presenta una naturaleza bidimensional (fármaco y bacteria), y el problema es, sin embargo, tridimensional (huésped, microorganismo y fármaco) (195), por lo que hay que tener en cuenta factores que intervienen en la eficacia, y no han sido incluidos en la estandarización citada de la metodología de la CMI.

3. ENSAYO CLINICO FASE I.

Es posible estimar el régimen de dosificación adecuado para humanos a través de la combinación de cinética y datos del modelo animal de eficacia, con datos farmacocinéticos en humanos (170). Los EC fase I determinan el comportamiento farmacocinético del fármaco en humanos; adicionalmente pueden proveer datos farmacodinámicos que evidencien datos con respecto a la actividad antimicrobiana (170).

3.1. Farmacocinética.

Las concentraciones séricas de CMX encajan en un modelo monocompartimental, usado para calcular los parámetros farmacocinéticos. CMX presenta $t_{1/2}$ de aproximadamente 2 h., con un volumen de distribución comparable al de otras cefalosporinas. La concentración sérica máxima con una dosis única de 2 g. fue el doble que la obtenida con 1 g., proporción que se mantiene al relacionar las AUC obtenidas tras la administración de ambas dosificaciones. La ausencia de diferencias entre ambas dosis en $t_{1/2}$, volumen de distribución y aclaramiento sugiere la ausencia de saturación del modelo; el incremento lineal en la C_{max} y AUC, proporcional a la dosis, confirma la farmacocinética lineal (145).

Las diferencias observadas entre las concentraciones medidas por HPLC y bioensayo, y el aumento significativo del AUBC con la dosis alta, sugieren un posible metabolito. Un metabolito N-acetil de CMX ha sido detectado en estudios animales (206), pero no ha sido encontrado en orina humana (207). Alternativamente, el suero normal puede incrementar la bioactividad antibacteriana (208); esta posibilidad puede ser observada en las muestras que contienen altas concentraciones de CMX, donde aparecen diferencias entre HPLC y bioensayo, y como veremos posteriormente presentan una actividad bactericida aumentada.

El uso, como cepa lectora en el bioensayo, de B.subtilis ATCC 6633 puede haber contribuido a la diferencia observada, ante la distinta linealidad, de la curva bioensayo/HPLC con la observada cuando el Vibrio percolans ATCC 8461 es utilizado en otros estudios (153). Aunque la correlación entre el bioensayo con B.subtilis y HPLC no haya sido determinada previamente (153), en nuestro estudio se observó una buena correlación.

CMX alcanza niveles plasmáticos mayores que la CMI_{90} (≤ 0.5 mcg/ml) para enterobacteriaceas comunes (E.coli, Klebsiella spp, Proteus mirabilis,...) (137), durante al menos 16 h. con la dosis

de 2 g., y 12 h. con la dosis de 1 g. La CMI₉₀ de B.fragilis (2 mcg/ml) (137) es superada por parte de los niveles séricos 12 h. con la dosis de 2 gr. Un esquema de dosificación de 2 gr. cada 12 h. parece lógico para estudiar en los futuros EC de infección intraabdominal en el paciente inmunocompetente.

3.2. Farmacodinamia.

3.2.1. Actividad bactericida sérica.

Para la valoración de cambios de dosificación son requeridos estudios de laboratorio adicionales: actividad bactericida, efecto postantibiótico y la determinación de los títulos bactericidas séricos (169). Los dos primeros apartados ya han sido comentados, y el tercero nos será útil para evaluar la posibilidad de distintas dosificaciones con respecto a infección intraabdominal en pacientes no inmunocomprometidos, como peritonitis bacteriana espontánea (PBE) en pacientes cirróticos (motivada por alteraciones en los mecanismos defensivos).

La unión a proteínas de CMX es del 68% (135) (168). Como sólo el antibiótico libre es activo (85), puede esperarse un incremento falso de la actividad bactericida sérica si se usa caldo como diluyente (209). Esto puede ser importante al correlacionar las actividades "in vitro" y bactericida sérica, ya que una tasa de unión a proteínas del 70% se utiliza como límite a partir del cual el "breakpoint" de susceptibilidad antimicrobiana es reducido un 50% (25). El uso de suero humano ha sido propuesto para obviar este problema (153), aunque no siempre refleja la situación "in vivo" (210), debido a las diferencias potenciales intersujetos con respecto a la unión a proteínas (211).

Aunque el suero humano al 10% tiene una influencia escasa en la acción bactericida de CMX (142), fue preferido el uso del propio suero de cada voluntario como diluyente para asemejarse en lo posible a las condiciones "in vivo" (concentración final

de suero humano normal: 75%). Las proteínas totales y la albúmina estuvieron dentro de la normalidad en todos los sujetos antes y después de la administración de CMX. La posible contribución a la actividad bactericida sérica detectable a diluciones altas, de los títulos esperados en suero normal (99), puede ser descartada ya que los PBS fueron <2 en las muestras previas a la administración del antibiótico, aunque las CMBs fueron 1 dilución menor para el E.coli ATCC 25922 cuando el test se realizó con 50% de suero humano normal.

El uso de suero humano no inactivado (la inactivación por calor imposibilita la acción combinada de suero y antibiótico (186)) de cada voluntario (tanto como muestra a ensayar, como parte del diluyente), el incremento de la actividad bactericida del antibiótico por el suero humano normal (176), el efecto combinado de concentración antibiótica y dilución sérica en esta acción conjunta (186), y la influencia de componentes séricos ultrafiltrables (99) en la actividad antimicrobiana de los antibióticos betalactámicos, puede explicar los altos PBS en las muestras que contenían altas concentraciones de CMX. Recordemos el efecto del suero humano sobre la actividad bactericida de CMX "in vitro" frente a B.fragilis, de forma dosis-dependiente, hasta alcanzar diferencias estadísticamente significativas vs ausencia de suero humano, en las concentraciones ≥ 8 mcg/ml (142), argumento que puede contribuir a explicar una mayor actividad "in vivo" que la predecible "in vitro", como vimos en el modelo animal.

Se obtuvo una fuerte correlación entre las concentraciones plasmáticas medidas por HPLC y los PBS frente a las cuatro cepas ensayadas; también se obtuvo una correlación similar cuando se utilizaron los niveles séricos obtenidos por bioensayo, y al dividir las concentraciones plasmáticas por los valores de la CMI o CMB.

En este estudio el AUC no fue un buen predictor de la actividad bactericida sérica, ya que al duplicar la dosis de CMX

se produjo un aumento de 1.8 veces en la AUC, mientras que la AUBC aumentó al menos 4.5 veces. Más aún, cepas con diferentes CMI y CMB presentan similares AUBCs.

La alta dependencia del valor de la CMB de recrecimiento, no necesariamente detectable en la lectura de la CMI, puede explicar los resultados de la CMB y de la CMB_{6h} para Serratia marcescens ATCC 8100. Alternativamente, $CMB_{6h} > CMB$ para las otras tres cepas ATCC (E.coli, K.pneumoniae y B.fragilis) puede ser debida a una tasa menor de muerte bacteriana. En este estudio los $PBS \geq 8$ ó < 8 se correlacionaban mejor con la concentración sérica/ CMB_{6h} por encima o por debajo de la unidad, respectivamente, que cuando se usaban parámetros estándar como CMI o CMB. El nivel plasmático de CMX mayor que la CMB_{6h} es más predictivo de un $PBS \geq 8$, que la CMI o la CMB. Asimismo, si la concentración de CMX es menor que la CMB_{6h} , la predicción es de un $PBS < 8$.

Vimos en la Introducción que antibióticos que actúan sobre la membrana externa a concentraciones fisiológicas (112) presentan una rápida actividad bactericida (111), con una traducción "ex vivo" de aumento de la actividad bactericida sérica mayor que la esperable por las concentraciones plasmáticas (110). Se ha sugerido que CMX actúa también en esta membrana bacteriana externa, además de las habituales dianas de los betalactámicos, hecho que puede influir en su rápida acción lítica (190). Esta propiedad farmacodinámica puede haber contribuido, junto al efecto sinérgico del suero, a la actividad bactericida sérica aumentada en las muestras con altas concentraciones de CMX y en la dosificación superior.

Siempre se ha mantenido la opinión de que un $PBS \geq 8$ es sinónimo de idoneidad terapéutica (212). PBS adecuados son mantenidos al menos 4 h. con la dosis de 1 gr., y 8 h. con la dosis de 2 gr. La actividad bactericida aumentada durante estos periodos de tiempo puede ser beneficiosa terapéuticamente, debiendo adecuarse la terapia antimicrobiana a estos periodos de

tiempo cuando la actividad bactericida debe ser optimizada, ante alteraciones inmunitarias como ocurre en el paciente cirrótico con PBE. Parece adecuado estudiar un esquema de dosificación de 2 g. cada 8 h. en futuros EC en esta patología.

3.2.2. Inmunomodulación.

Hemos comentado que una de las patologías a ensayar CMX en futuros EC es en la PBE en paciente cirrótico. En este tipo de pacientes existen déficits en la inmunidad sérica (213), complemento, por lo que se realizaron estudios de actividad "ex vivo" sobre la actividad bactericida sérica con suero normal de los voluntarios, con el fin de optimizar los efectos bactericidas a lo largo del intervalo de dosificación. Pero estos pacientes también presentan una depresión de la actividad fagocítica del sistema retículo-endotelial (214) y disfunción granulocitaria (215). Las recomendaciones generales para la evaluación clínica de fármacos antiinfecciosos (170) establecen que los estudios "ex vivo" pueden ser apropiados ante las alteraciones en la fagocitosis.

Estudiamos el efecto del antibiótico sobre las funciones polimorfonucleares con respecto a Candida albicans, microorganismo absolutamente resistente a CMX a concentraciones fisiológicas, con la finalidad de evaluar el efecto aislado de CMX sobre estas células del sistema inmune como parte del desarrollo preterapéutico. Dejamos el estudio del efecto del antibiótico sobre la combinación célula inmunitaria (PMN) y agente etiológico (básicamente E.coli en la PBE) como estudio "ex vivo", parte del EC en PBE del paciente cirrótico, en el futuro desarrollo clínico de CMX.

La capacidad de adherencia de CMX no quedó afectada, al igual que ocurre en otros betalactámicos (156), y no indujo a cambios en el número de PMN fagocitantes, pero disminuyó la eficacia y poder microbicida en contraste con el control. Sin embargo, aumentó la adherencia de levaduras a PMN de una forma

dosis-dependiente y estadísticamente significativa en las relaciones pico sérico y número de levaduras asociadas a PMN (10). También se encontró una relación significativa en menor grado entre AUC y este índice fagocítico, pero no existió relación entre éste y el nivel sérico a los 90 minutos de la infusión (momento de extracción de los PMN) (10b). Esto parece indicar que el efecto inmunomodulatorio de CMX es nivel-dependiente.

El efecto inmunomodulatorio de CMX no había sido investigado previamente. De cualquier forma, diversos estudios con otras cefamicinas muestran resultados controvertidos. Así, en otro estudio (216) con CFX no se encuentra influencia en la fagocitosis pero sí una inhibición de la actividad microbicida de los fagocitos "in vivo". Los datos disponibles confirman la controversia entre los distintos estudios posiblemente debida a la metodología utilizada y el fármaco ensayado (10b). La clarificación en este tema podría venir de la realización del estudio "ex vivo" frente a los agentes etiológicos bacterianos en el futuro EC en PBE, con mayor trascendencia pragmática desde el punto de vista de la eficacia clínica.

Desde el punto de vista explicativo queda claro que existe una actividad inmunomodulatoria de CMX de forma exclusiva, al excluir el efecto sobre el microorganismo al utilizar Candida albicans como diana del PMN. Esta actividad inmunomodulatoria es nivel-dependiente, al igual que la actividad "ex vivo" bactericida sérica (con la metodología utilizada: el propio suero de cada voluntario sin inactivar como diluyente, preservando los factores inmunitarios séricos), y a diferencia de la actividad "in vivo" que, como hemos visto, y al igual que el resto de los betalactámicos, es tiempo-dependiente.

4. DESARROLLO CLINICO. PREDICCIÓN DE EFICACIA.

A lo largo de la Discusión hemos comentado que el espectro de CMX lo sitúa en el campo de la infección intraabdominal. Desde un punto de vista farmacocinético la penetración en exudado pélvico tras 1 gr. de CMX es alta, alcanzando niveles de 45 mcg/ml a las 4 h. y 8 mcg/ml a las 12 h. (217). Los EC diseñados intentan cubrir distintos aspectos de la administración de CMX: huésped inmunocompetente o inmunocomprometido, tratamiento o profilaxis, monoterapia o biterapia, maniobra quirúrgica concomitante o tratamiento conservador, e infección monomicrobiana o polimicrobiana.

Se diseñaron 4 EC:

- a. Infección intraabdominal: huésped inmunocompetente, tratamiento antibiótico, monoterapia, cirugía e infección polimicrobiana.
- b. Profilaxis de cirugía colorectal: huésped inmunocompetente, profilaxis antibiótica, monoterapia, cirugía e infección polimicrobiana.
- c. Enfermedad pélvica inflamatoria (EPI): huésped inmunocompetente, tratamiento antibiótico, biterapia (con doxiciclina), tratamiento conservador e infección polimicrobiana.
- d. Peritonitis bacteriana espontánea (PBE): huésped inmunocomprometido, tratamiento antibiótico, monoterapia, tratamiento conservador e infección monomicrobiana.

En el desarrollo clínico con antimicrobianos los EC fases II y III se pueden solapar representando diferentes estadios de la investigación clínica (170). Los cuatro EC fueron diseñados como controlados (con el estándar comunitario), randomizados y multicéntricos.

En infección intraabdominal, tanto desde el punto de vista de la terapéutica como de la profilaxis, el uso de antibióticos (o combinaciones de los mismos) que amplíen el espectro no

asegura mejores resultados clínicos (218); debido a ello la investigación clínica debe basarse en la optimización de la farmacología, toxicidad y relación coste/beneficio, manteniendo resultados clínicos comparables (218). Por ello, la muestra se estimó a partir de la hipótesis nula (ausencia de diferencias entre el tratamiento problema y control), que en EC con antibióticos considera valores de delta del 10% al 20% (219), dependiendo de la patología y reclutamiento previsto de la misma (20% para a., 15% para b., c. y d.).

Teniendo en cuenta la eficacia de los fármacos control (estándar comunitario) de los distintos EC: 75% (220) para metronidazol (500 mg/8 h.) más gentamicina (80 mg/8 h.) en a., 92.3% (221) para CFX (3 dosis IV de 2 gr) en b., 96%-100% (222) - 96.8% (223)- para CFX (2 gr/6 h.) más doxiciclina IV (100 mgr/12 h. hasta la desaparición de la fiebre durante 48 h., de la leucocitosis, del Blumberg y de la sensibilidad a la palpación) seguida de la misma dosis diaria de doxiciclina oral (hasta 15 días después del inicio del tratamiento) en c., y 85% (224) para CTX (2 gr IV/4 h.) en d.; y, aplicando la fórmula de cálculo de tamaño de muestra (225) para un error tipo I=0.05 y tipo II=0.2, obtenemos un número de pacientes por grupo de tratamiento (problema y control), en cada EC, igual a 74 en a., 50 en b., 36 en c. (que aumentarían a 45 al estimar una pérdida del 20% en el seguimiento) y 90 en d.

Los "breakpoints" se establecen, siguiendo las recomendaciones NCCLS (M3-23T), sobre la base de la farmacocinética y farmacodinámica del fármaco y la relación entre la CMI y la respuesta clínica (195), pudiendo variar posteriormente según los laboratorios recogen datos clínicos, poniéndose al día en las publicaciones anuales NCCLS. Teniendo en cuenta el número de pacientes que integran el desarrollo

clínico de un antimicrobiano, es fácil llegar a un consenso sobre el "breakpoint" de sensibilidad, ya que la mayoría de los pacientes, tanto de los fármacos problema como control estarán infectados por bacterias sensibles (no sería ético escoger como fármacos control aquéllos que presentaran una alta tasa de resistencias, ante la mayor capacidad de predicción de esta categoría de susceptibilidad). Tomando como base la estandarización NCCLS en la determinación de la CMI, cuando el resultado de un TSA cae dentro de la categoría resistencia, determinada por los "breakpoints" establecidos, el resultado de la predicción será probablemente fracaso, mientras que la predicción de la categoría sensible es cuestionable, teniendo siempre en cuenta que la predicción en los sistemas de susceptibilidad se refiere a la variable bacteriológica y no clínica (195) (únicamente existirá predicción clínica en aquellas patologías en que ambas variables estén íntimamente relacionadas).

Desde luego tiene interés llegar a un consenso sobre el "breakpoint" de sensibilidad a lo largo del desarrollo de un antimicrobiano. Sin embargo, ante la mayor capacidad de predicción de la categoría resistencia, sería mucho más importante llegar a un consenso sobre el "breakpoint" de resistencia. Esto no es posible ante el escaso número de pacientes infectados por bacterias resistentes a lo largo del desarrollo del antimicrobiano, y ya no estamos en las épocas en las que se pretendía, por parte de la FDA, exigir estudios para cada germen en una determinada patología para obtener la aprobación de una indicación, pretensión a todas luces imposible de cumplir.

Hemos observado, en el modelo animal realizado como parte del requerimiento de un sistema de predicción adecuado antes de los EC (169), que aumenta la predicción cuando en los TSA se incluye el estudio de los efectos inóculo y osmolar, que para algunos fármacos aumentan el valor de la CMI cuando ésta se realiza en medio completo y con inóculo alto. Con la única cepa

estudiada en este modelo bacteriano, para algunos binomios cepa-antibiótico el aumento de la CMI implicaba un aumento de la capacidad de predicción de eficacia del modelo, ya que, como hemos visto, los efectos inóculo, principalmente, y osmolar modulan la actividad "in vivo".

Sería interesante, a lo largo del desarrollo clínico de CMX, realizar las CMI de los aislamientos clínicos, tanto de forma estándar como con medio completo e inóculo alto, y tanto para el fármaco problema como para el fármaco control. De esta forma, un mayor porcentaje de aislamientos caería dentro o se aproximaría a la categoría resistencia (debido a que distintos binomios cepa-antibiótico presentarían efectos inóculo o/y osmolar que variarían su CMI) que presenta mayor capacidad de predicción. Así, y tras el desarrollo clínico, quizá podría llegarse a un consenso sobre los "breakpoints" de resistencia, ya sea sobre la base de variación de las condiciones de laboratorio (lo que sería difícil al requerir una nueva estandarización), o disminución del valor de los "breakpoints" para los binomios que presenten efecto inóculo o/y osmolar.

VI. CONCLUSIONES

1. El espectro del antibiótico problema (CMX), objeto del desarrollo posttoxicológico y preterapéutico de esta tesis, lo sitúa como candidato al desarrollo clínico en el campo de la infección intraabdominal. Esto es debido a una actividad bacteriostática, frente a los agentes etiológicos de estas infecciones, superior al fármaco control del mismo grupo (CFX), aunque mucho menor que la de las cefalosporinas de 3ª generación frente a las enterobacteriaceas; junto con la ausencia de una actividad significativamente mayor que la de los antibióticos habitualmente usados en otras patologías frente a sus respectivos agentes etiológicos.

2. La actividad "in vivo" de CMX, en el modelo animal de infección intraabdominal monobacteriana, resultó significativamente mayor que la de los antibióticos control, tanto desde el punto de vista de mortalidad obtenida a una dosis determinada, de la dosis efectiva mínima, como del número de veces que la dosis efectiva mínima debe superar la CMI (DE/CMI). Esta actividad "in vivo" no es predecible por la actividad bacteriostática "in vitro" ya que ésta es similar o muy inferior a la de los fármacos control.

3. Desde el punto de vista microbiológico, factores como los efectos inóculo y osmolar, el efecto del suero humano, el mecanismo de acción y el efecto de concentraciones subinhibitorias, contribuyen a explicar esta dicotomía entre la actividad "in vivo" e "in vitro". Desde el punto de vista farmacocinético, los factores temporales, dependientes de la vida media, también participarían en la explicación.

4. Los efectos inóculo y osmolar modulan la actividad bacteriostática (CMI), la actividad bactericida (tasa de muerte bacteriana, en magnitud y tiempo) y la actividad bacteriolítica (CLM), a favor de los fármacos que no los presentan. Cuando se tienen en cuenta ambos efectos, al menos se equiparan las actividades bacteriostática y bactericida, y aumenta la actividad bacteriolítica, con respecto a los fármacos control.

5. La actividad bacteriostática, realizada en condiciones que tengan en cuenta los efectos inóculo y osmolar, resulta más predictiva de la actividad bactericida y de la actividad bacteriolítica. El simple cambio de medio de cultivo y de tamaño del inóculo aumenta la predicción de eficacia en el modelo animal.

6. Desde el punto de vista farmacocinético, los factores tiempo-dependientes resultan más predictivos de eficacia terapéutica en el modelo animal que los factores dosis-dependientes (nivel sérico en el pico y AUC). Desde un punto de vista farmacodinámico, el número de vidas medias a partir del pico sérico, o tiempo interdosis, que el antibiótico supera la CMI realizada en medio completo y frente a inóculo alto, equipara el nivel de predicción para los antibióticos problema y control, y resulta más predictivo que cualquier otra relación entre factores farmacocinéticos y microbiológicos.

7. La actividad "ex vivo" de CMX es nivel-dependiente, tanto desde el punto de vista de la variable actividad bactericida sérica como del de la variable actividad inmunomodulatoria, y a diferencia de la actividad "in vivo" que, como hemos visto, es tiempo-dependiente. Desde el punto de vista microbiológico, la actividad bactericida sérica es más predecible por la CMB_{6h} que por otros TSA.

8. La dosificación de CMX a ensayar en futuros EC de infección intraabdominal debería ser de 2 g. cada 12 h. en el paciente no inmunocomprometido, basada en su acción antibacteriana tiempo-dependiente; y de 2 g. cada 8 h. en el paciente inmunocomprometido, basada en la acción antibacteriana anterior y en la actuación conjunta, nivel-dependiente, con factores inmunológicos, ya sean celulares (inmunomodulación) o séricos (actividad bactericida sérica), ante la necesidad de optimización de la actividad bactericida.

9. Ante la discrepancia entre los resultados de la actividad "in vivo" y la actividad "in vitro", parecen lógicos los requerimientos de las últimas recomendaciones editadas para el desarrollo de antimicrobianos: estudio de dicha discrepancia y elaboración de un método de predicción de eficacia. Para ello, es necesaria información previa (a los EC terapéuticos), también requerida, sobre actividad bactericida, mecanismo de acción y efecto de concentraciones subinhibitorias, junto a la clásica información sobre espectro, resistencia y efectos de las condiciones de cultivo. Asimismo, parecen adecuadas las recomendaciones de estudios "ex vivo", ante alteraciones de la fagocitosis, y actividad bactericida sérica, en el caso de dosificaciones diferentes.

10. A pesar de la estandarización de la CMI, la toma en consideración de los efectos inóculo y osmolar, junto con factores farmacocinéticos dependientes de la vida media, podría aumentar la capacidad de predicción de eficacia, sólo clara en el caso de la categoría de resistencia, de los TSA a las otras categorías de susceptibilidad, en futuros EC con antibióticos del grupo estudiado.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy (1989). The Clinical Evaluation of Antibacterial Drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* 23. Supp. B.
2. Zak O and O'Reilly T. (1990). Animals Models as Predictors of the Safety and Efficacy of Antibiotics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9:472-478.
3. World Health Organization, Regional Office for Europe (1986). Guidelines for the Clinical Investigation of Antibacterial Drugs n° 2. Preclinical Testing. Revised draft. Copenhagen, p. 3.
4. Dalhoff A and Ullmann U (1990). Correlation between Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Efficacy of Antibacterial Agents in Animal Models. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9:479-487.
5. Carbon C J (1991). Animal Models and the Clinical Use of Antibiotics. *News and Views on Infection* (Newsletter of the Infectious Disease Council). 1:3-7.
6. Carbon C (1990). Significance of Tissue Levels for Prediction of Antibiotic Efficacy and Determination of Dosage. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9:510-516.
7. Ellner P D and Neu H C (1981). The Inhibitory Quotient. *JAMA* 246:1575-1578.
8. Klastersky J; Daneau D; Swings G and Weerts D (1974). Antibacterial Activity in Serum and Urine as a Therapeutic Guide in Bacterial Infections. *J. Infect. Dis.* 129:187-194.
9. O'Grady F (1985). Antibiotics and Host Defences. In "The Scientific Basis of Antimicrobial Chemotherapy" (D Greenwood and F O'Grady, Eds.). Cambridge University Press. Cambridge. p.341-366.
10. Corrales I; Aguilar L; Mato R; Frías J; Esteban C and Prieto J (1991). Immunomodulating Effect of Cefminox (MT-141). Phase I Study. Abstracts of the 17th International Congress of Chemotherapy. no. 100. Berlin, June 23-28.
- 10b. Corrales I; Aguilar L; Mato R; Frías J and Prieto J (1993). Immunomodulatory Effect of Cefminox. Phase I Study. Enviado a *J. Antimicrob. Chemother.*
11. Eagle H; Fleischman R and Musselman A D (1950). Effect of Schedule of Administration on the Therapeutic Efficacy of

Penicillin. *Am. J. Med.* 9:280-299.

12. Eagle H; Fleischman R and Levy M (1953). Continuous Versus Discontinuous Therapy With Penicillin. *New Eng. J. Med.* 248:481-488.

13. Norrby S R (1986). Evaluation of New Beta-Lactam Antibiotics: Introduction and Summary. *Rev. Infect. Dis.* 8, Sup. 3:235-236.

14. Thrupp L D (1986). Susceptibility Testing in Liquid Media. In *Antibiotics in Laboratory Medicine* (V. Lorian, Ed.). 2nd ed. Williams and Wilkins. Baltimore, MD. pp. 93-158.

15. Hindler J A and Thrupp L D (1989). Interpretative Guidelines for Antimicrobial Susceptibility Test Results: What Do They Mean?. *Clin. Microbiol. Newsl.* 11:129-134.

16. Gerberding J L and Sande M A (1986). Limitations of Animals Models in Predicting Beta-Lactam Efficacy for Endocarditis and Meningitis. *Rev. Infect. Dis.* 8 (Supp.3): 315-318.

17. Baquero F (1990). European Standards for Antibiotic Susceptibility Testing: Towards a Theoretical Consensus. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 9:492-495.

18. National Committee for Clinical Laboratory Standards (1988). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test, 4th ed. Tentative Standard M2-T4. NCCLS, Villanova, PA.

19. National Committee for Clinical Laboratory Standards (1988). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically, 2nd ed. Tentative Standard M7-T2. NCCLS, Villanova, PA.

20. Acar J F and Goldstein F W (1986). Disc Susceptibility Test. In *"Antibiotics in Laboratory Medicine"*. (Ed. V. Lorian). 2nd ed. Williams and Wilkins, Baltimore M D. pp. 27-60.

21. D'Amato R F et al (1985). Evaluation of the Biogram Antimicrobial Susceptibility Test System. *J. Clin. Microbiol.* 22:793-798.

22. Bauer A W et al (1966). Antibiotics Susceptibility Testing by Standardized Single Disc Method. *Am. J. Clin. Path.* 36:493-496.

23. Ericsson H M and Sherris J C (1971). Antibiotic Sensitivity Testing. Report of an International Collaborative Study. *Acta Path. et Microbiologica. Sect B, Supp.* 217.

24. Murray P R (1990). Clinical Predictive Value of In Vitro

- Susceptibility Test. Clin. Microbiol. Newsl. 12:44-45.
25. Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy (1991). A Guide to Sensitivity Testing. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 27, Suppl. D.
 26. Baquero F (1991). From Accuracy Towards Truth: the BSAC Working Party's Guide to Sensitivity Testing. J. Antimicrob. Chemother. 27:701-705.
 27. Wold S (1984). General Discussion of Conference. In "Drug Design: Fact or Fantasy". (G Jolles and K R H Woolridge, Eds.). Academic Press, London. pp. 253-254.
 28. Zak O; Mett H and O'Reilly T (1990). Remarks on the Screening of Antibiotics for Antibacterial Activity. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 9:462-465.
 29. Wilkins T D and West S E (1983). Therapy of Anaerobic Infection. Infection. 11, supp. 2:105-109.
 30. McCracken G H; Nelson J D and Grim L (1983). Pharmacokinetics and Bacteriological Efficacy of Cefoperazone, Cefuroxime, Ceftriaxone and Moxalactam in Experimental Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae Meningitis. Antimicrob. Agents Chemother. 11:233-238.
 31. Pangon B; Joly V; Vallois J M et al (1987). Comparative Efficacy of Cefotiam, Cefmenoxime and Ceftriaxone in Experimental Endocarditis. Correlation With Pharmacokinetics and In Vitro Efficacy. Antimicrob. Agents Chemother. 31:518-522.
 32. Dayan A D (1991). The Limitations of Animal Studies: What Can and Cannot Be Predicted for Man. Drug Information Journal. 25:165-170.
 33. Wise R (1986). Protein Binding and Related Properties of Antibiotics and their Pharmacological and Clinical Relevance. In "Prediction and Assessment of Antibiotic Clinical Efficacy" (F O'Grady and A Percival, Eds.). Academic Press. London & Orlando. pp. 75-95.
 34. Kunin C M (1967). Clinical Significance of Protein Binding of the Penicillins. N. Y. Acad. Sci. 145:282-290.
 35. Gerding D N; Kromhout J P; Sullivan J J and Hall W H (1976). Antibiotic Tissue Penetration of Ascitic Fluid in Dogs. Antimicrob. Agents Chemother. 10:850-855.

36. Merrikin D J; Briant J and Rolinson G N (1983). Effect on Protein Binding on Antibiotic Activity In Vivo. *J. Antimicrob. Chemother.* 11:233-238.
37. Bergan T (1986). Requirements for Pharmacokinetics Evaluation of Antibiotics in Phase I Studies. *Rev. Infect. Dis.* 8 (Suppl. 3):319-324.
38. O'Grady F (1986). Introduction. In "Prediction and Assessment of Antibiotic Clinical Efficacy" (F O'Grady and A Percival, Eds.). Academic Press. London and Orlando. pp. 1-2.
39. O'Grady F (1986). Summary of Discussion. In "Prediction and Assessment of Antibiotic Clinical Efficacy". (F O'Grady and A Percival, Eds.). Academic Press. London & Orlando, pp. 193-195.
40. Young L S (1986). Clinical Trials in Severe Infection. In "Prediction and Assessment of Clinical Efficacy" (F O'Grady and A Percival, Eds.). Academic Press. London & Orlando. pp. 172-181.
41. Zak O and Sande M A (1982). Correlation of In Vitro Antimicrobial Activity of Antibiotics With Results of Treatment in Experimental Animal Models and Human Infection. In "Action of Antibiotics in Patients". (Ed. Sabath L D). Bern, Switzerland: Hans Huber Publishers. pp. 55-67.
42. Weinstein R J; Young L S and Hewitt W L (1975). Comparison of Methods for Assessing In Vitro Antibiotic Synergism against *Pseudomonas* and *Serratia*. *J. Lab. Clin. Med.* 86:553-562.
43. Holm S E (1986). Interaction between Beta-Lactam and other Antibiotics. *Rev. Infect. Dis.* 8 (Suppl. 3):305-314.
44. Spratt B G (1977). The Mechanism of Action of Mecillinam. *J. Antimicrob. Chemother.* 3 (Suppl B) 13-19.
45. van der Voet G B; Mathie H and van Furth R (1983). Antibacterial Activity of Combinations of Mecillinam and Ampicillin In Vitro and in Normal Granulocytopenic Mice. *Scand. J. Infect. Dis.* 15:91-96.
46. Michel J; Jacobs J and Sacks T (1977). Bactericidal Synergistic Effect Due to Chloramphenicol-Induced Inhibition of Staphylococcal Penicillinase. *Chemotherapy* 23:32-36.
47. Fu K P and Neu H C (1979). Comparative Inhibition of Bectalamases by Novel Beta-Lactam Compounds. *Antimicrob. Agents. Chemother* 15:171-176.

48. Jawetz E; Gunnison J B; Speck R S and Coleman V R (1951). Studies on Antibiotic Synergism and Antagonism: the Interference of Chloramphenicol With the Action of Penicillin. *Arch. Intern. Med.* 87:349-359.
49. Rahal J J (Jr) (1978). Antibiotic Combinations: the Clinical Relevance of Synergy and Antagonism. *Medicine* 57:179-195.
50. Sanders C C (1984). Inducible Betalactamases and non Hydrolytic Resistance Mechanisms. *J. Antimicrob. Chemother.* 13:1-3.
51. Harder W and Dijkhuizen L (1983). Physiological Responses to Nutrient Limitation. *Ann. Rev. Microbiol.* 37:1-23.
52. Weinstein L; Daikos G K and Perrin T S (1951). Studies on the Relationship of Tissue Fluid and Blood Levels of Penicillin. *J. Lab. Clin. Med.* 38:712-718.
53. Vogelmann B and Craig W A (1986). Kinetics of Antimicrobial Activity. *J. Pediatr.* 108:835-840.
54. Vogelmann B; Gudmundsson S; Leggett J; Turnidge J; Ebert S and Craig W A (1988). Correlation of Antimicrobial Pharmacokinetic Parameters With Therapeutic Efficacy in an Animal Model. *J. Infect. Dis.* 158:831-847.
55. Ernst J D and Sande M A (1982). Selected Examples of Failure of In Vitro Testing to Predict In Vivo Responses to Antibiotics. In "Action of Antibiotic in Patients". (Ed. Sabath L D). Bern, Switzerland: Hans Huber Publishers, pp.68-73.
56. O'Grady F W and Percival A (Eds.) (1986). Prediction and Assessment of Antibiotic Clinical Efficacy. Academic Press (Harcourt Brace Jovanovich, Publishers). London & Orlando.
57. Boman H G and Eriksson K G (1963). Penicillin Induced Lysis in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 31:339-352.
58. Mitchell P and Moyle J (1957). Autolytic Release and Osmotic Properties of "Protoplasts" from *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* 16:184-194.
59. Tuomanen E (1986). Phenotypic Tolerance: The Search for Beta-Lactam Antibiotics That Kill Nongrowing Bacteria. *Rev. Infect. Dis.* 8, Supp. 3, 279-291.
60. Lepper M H and Dowling H F (1951). Treatment of Pneumococcal Meningitis With Penicillin Compared With Penicillin Plus

Aureomycin: Studies Including Observations on an Apparent Antagonism between Penicillin and Aureomycin. Arch. Intern. Med. 88:489-494.

61. Tomasz A and Waks S. Mechanism of Action of Penicillin: Triggering of the Pneumococcal Autolytic Enzyme by Inhibitors of Cell Wall Synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72:4162-4166.

62. Brown M R W; Collier P J and Gilbert P (1990). Influence of Growth Rate on Susceptibility to Antimicrobial Agent: Batch Culture and Continuous Culture Studies. Antimicrob. Agents Chemother. 34:1623-1628.

63. Gilbert P; Collier P J and Brown M R W (1990). Influence of Growth Rate on Susceptibility to Antimicrobial Agents: Biofilms, Cell Cycle and Dormancy. Antimicrob. Agents Chemother. 34:1865-1868.

64. Brown M R W; Costerton J W and Gilbert P (1991). Extrapolating to Bacterial Life Outside the Test Tube. J. Antimicrob. Chemother. 27:565-567.

65. Brown M R W and Williams P (1985a). The Influence of Environment on Envelope Properties Affecting Survival of Bacteria in Infections. Annu. Rev. Microbiol. 39:527-556.

66. Costerton J W; Cheng K J; Geesey K G et al (1987). Bacterial Biofilms in Nature and Disease. Annu. Rev. Microbiol. 41:435-464.

67. Brown M R W; Allison D G and Gilbert P (1988). Resistance of Bacterial Biofilms to Antibiotics: a Growth Rate Related Effect?. J. Antimicrob. Chemother. 22:777-780.

68. Heszen M T and Kaye D (1989). Infections Associated With Foreign Bodies in Urinary Tract. In "Infections Associated With Indwelling Medical Devices" (A L Bisno and F A Waldvogel, Eds.). American Society for Microbiology. Washington DC. pp.199-214.

69. Bisno A L and Waldvogel F A (Eds.) (1989). Infections Associated With Indwelling Medical Devices. American Society for Microbiology. Washington DC.

70. Gallant J (1979). Stringent Control in E. coli. Annu. Rev. Genet. 13:393-415.

71. Ramey W D and Ishiguro E E (1978). Site of Inhibition of Peptidoglycan Biosynthesis During Stringent Response in Escherichia coli. J. Bacteriol. 135:71-77.

72. Soriano F; Ponte C; Santamaría M and Jiménez-Arriero M (1990). Relevance of the Inoculum Effect of Antibiotics in the Outcome of Experimental Infections Caused by *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 25:621-627.
73. Soriano F; Avilés P and Aguilar L (1991). Comparative In Vitro and In Vivo Activity of Cefminox and other Six Betalactam Antibiotics against *E.coli*. Abstracts of the 17th International Congress of Chemotherapy (Berlín): no.2079.
74. Sande M A and Mandel G L (1980). Antimicrobial Agents: General Considerations. In *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. (L S Goodman and Gilman, Eds.). 6th edn., MacMillan, New York, pp. 1080-105.
75. Dalhoff A and Cullmann W (1984). Specificity of Betalactamase Induction in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 14:349-357.
76. Cullmann W; Dalhoff A and Dick W (1983). Nonspecific Induction of Bectalactamase in *Enterobacter cloacae*. *J. Infect. Dis.* 148:p765.
77. Livermore D M (1990). Resistance to Beta-Lactams, and Bectalactamase Induction. In *The Clinical Importance of Beta-Lactam Resistance* (D M Livermore, Ed.). *Current Topics in Infectious Diseases and Clinical Microbiology*. Vol. 3:3-10.
78. Greenwood D (1986). Predicting Therapeutic Efficacy from In Vitro Tests: Unconventional In Vitro Tests. In *Predicting and Assessment of Antibiotic Clinical Efficacy* (F O'Grady and A Percival, Eds.). Academic Press, London, pp.5-24.
79. Waterworth P M (1978). Uniformity in Sensitivity Test Media. *J. Antimicrob. Chemother.* 4:4-6.
80. Bridson E Y ((1978). Die Zusammensetzung Unvollständig Definiertes Kulturmedien zur Überwindung des Antibiotischen Antagonismus. *Immunität und Infektion*, 6:229-232.
81. Greenwood D and O'Grady F (1973). Comparison of the Responses of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* to Seven Beta-Lactam Antibiotics. *J. Infect. Dis.* 128:211-222.
82. Lindberg F and Normark S (1986). Contribution of Chromosomal Betalactamases to Betalactam Resistance in Enterobacteria. *Rev. Infect. Dis.* 8 (Suppl 3):292-304.

83. Vu H and Nikaido H (1985), Role of Beta-Lactam Hydrolysis in the Mechanism of Resistance of a Betalactamase-Constitutive *Enterobacter cloacae* Strain to Expanded-Spectrum Beta-Lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27:393-398.
84. Wise R (1986). Methods for Evaluating the Penetration of Beta-Lactam Antibiotics into Tissues. *Rev. Infect. Dis.* 8 (Suppl.3):325-332.
85. Craig W A and Welling P G (1977). Protein Binding of Antimicrobials: Clinical Pharmacokinetics and Therapeutic Implications. *Clin. Pharmacokinet.* 2:252-268.
86. Wise R (1983). Protein Binding of Beta-Lactams: the Effects on Activity and Pharmacology, particularly Tissue Penetration. *J. Antimicrob. Chemother.* 12:105-108.
87. Blint A J; Yeoman P; Kilburn P; Anderson R and Stansfield E (1981). The In Vitro Activity of Ceftazidime Compared With that of other Cephalosporins. *J. Antimicrob. Chemother.* 8 (B):47-51.
88. Bodey G P; Fainstein V and Hinkle A M (1981). Comparative In Vitro Study of New Cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 20:226-230.
89. Fu K D and Neu H C (1980). Antibacterial Activity of Ceftizoxime, a Beta-Lactamase-Stable Cephalosporin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17:583-590.
90. Bronsveld W; Stam J and MacLaren D M (1978). Concentrations of Ampicillin in Pleural Fluid and Serum after Single and Repetitive Dosis of Bacampicillin. *Scand. J. Infect. Dis. (Suppl. 14):*274-278.
91. Wise R; Donovan I A; Brose N S and Allcock J E (1981). The Penetration of Cefoxitin into Peritoneal Fluid. *J. Antimicrob. Chemother.* 8:453-457.
92. Joiner K; Lowe B R; Dzink J L and Bartlett J G (1981). Antibiotic Levels in Infected and Sterile Subcutaneous Abscesses in Mice. *J. Infect. Dis.* 143:487-494.
93. Norrby S R (1986). Relationship in Man of Pharmacokinetic Parameters for Antibiotics to Therapeutic Response. In "Prediction and Assessment of Antibiotic Clinical Efficacy" (F O'Grady and A Percival, Eds.). Academic Press. London & Orlando. pp. 55-73.

94. O'Neill P; Nye K; Donce G; Andrews J and Wise R (1990). Pharmacokinetics and Inflammatory Fluid Penetration of Cefpodoxime Proxetil in Volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:232-234.
95. Bergeron M G (1986). Tissue Penetration of Antibiotics. *Clin. Biochem.* 19:90-100.
96. Moore R D; Lietman P S and Smith C R (1987). Clinical Response to Aminoglycoside Therapy. Importance of the Ratio of Peak Concentration to Minimal Inhibitory Concentration. *J. Infect. Dis.* 155:93-99.
97. Drusano G L; Rayan P A; Standiford H C; Moody M R and Schimpff S C (1984). Integration of Selected Pharmacologic and Microbiologic Properties of Three New Beta-Lactams: A Hypothesis for Rationale Comparison. *Rev. Infect. Dis.* 3:357-363.
98. Norrby S R (1990). Clinical Trials of Antibiotics: Toward Improve Quality and International Standardization. *The Antimicrobic Newsletter* 7:57-63.
99. Leggett J E and Craig W A (1989). Enhancing Effect of Serum Ultrafiltrate on the Activity of Cephalosporins against Gram-Negative Bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:35-40.
100. Gillessen G; Suchumache M and Breuer-Werle M (1990). Interaction entre l'Effect Bactericide du Serum et des Antibiotiques a Concentrations Sous-Inhibitrices sur les Souches D'E. coli. *Pathol. Biol.* 38:436-440.
101. Brogden R N and Ward A (1988). Ceftriaxone. A Reappraisal of its Antibacterial Activity and Pharmacokinetic Properties, and a Update on its Therapeutic use With Particular Reference to Once-Daily Administration. *Drugs* 35:604-645.
102. Ahlstedt S (1981). The Antibacterial Effects of Low Concentrations of Antibiotics and Host Defence Factors: A Review. *J. Antimicrob. Chemother.* 8 (Suppl C):59-70.
103. Horne D and Tomasz A (1980). Lethal Effect of a Eterologous Murein Hydrolase on Penicillin-Treated *Streptococcus sanguis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17:235-246.
104. Odenholt-Tornqvist I; Löwdin E and Cars O (1991). Pharmacodynamic Effects of Subinhibitory Concentrations of Beta-Lactam Antibiotics In Vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:1834-1839.

105. Van der Auwera P (1991). Interactions between Antibiotics and Phagocytosis in Bacterial Killing. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 74:42-48.
106. Raponi G; Keller N; Overbeek B P; Rosenberg-Arsak M; van Kessel K P M and Verhoef J (1990). Enhanced Phagocytosis of Encapsulated *Escherichia coli* strains after Exposure to sub-MICs of Antibiotics is Correlated to Changes of the Bacterial Cell Surface. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:332-336.
107. Tylewska S; Hjertén C and Wadström T (1981). Effect of Subinhibitory Concentrations of Antibiotics on the Adhesion of *Streptococcus pyogenes* to Pharyngeal Epithelial Cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30:563-566.
108. Craig W A (1991). The Postantibiotic Effect. *Clin. Microbiol. Newsl.* 13:121-124.
109. Craig W A and Gudmundsson (1991). Postantibiotic Effect. In *Antibiotics in the Laboratory* (V Lorian, Ed.). 3rd. ed. Williams & Wilkins, Baltimore. pp. 403-431.
110. Zeiler H J; Beermann D; Wingender W; Forster D and Schacht P (1988). Bactericidal Activity of Ciprofloxacin, Norfloxacin and Ofloxacin in Serum and Urine After Oral Administration to Healthy Volunteers. *Infection* 16 (Suppl 1):19-23.
111. Diver J M and Wise R (1966). Morphological and Biochemical Changes in *Escherichia coli* after Exposure to Ciprofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* 18 (Suppl D):31-34.
112. Chapman J S and Georgopapadkou N H (1988). Routes of Quinolone Permeation in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32:438-442.
113. Klastersky J (1983). The Bactericidal Activity in Serum and its Prognostic Clinical Value. *Infection* 11 (Suppl 2):93-96.
114. Stratton C W; Winstein M P and Reller L B (1982). Correlation of Serum Bactericidal Activity With Antimicrobial Agent Level and Minimal Bactericidal Concentration. *J. Infect. Dis.* 145:160-168.
115. Wolfson J S and Swartz M N (1985). Serum Bactericidal Activity as a Monitor of Antibiotic Therapy. *N. Engl. J. Med.* 312:968-975.
116. Deeter R G; Winstein M P; Swanson K A; Gross J S and Bailey

- L C (1990). Crossover Assessment of Serum Bactericidal Activity and Pharmacokinetic of Five Broad Spectrum Cephalosporins in Elderly. *Antimicrob. Agent Chemother.* 34:1007-1013.
117. Amsterdam D (1990). Assessing Cidal Activity of Antimicrobial Agents: Problems and Pitfalls. *The Antimicrobial Newsletter* 7:49-56.
118. Klastersky J; Cappel R and Daneau D (1972). Clinical Significance of In Vitro Synergism between Antibiotics in Gram Negative Infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2:470-475.
119. Gerber A R; Brugger H P; Feller C; Stritzko T and Stalder B (1986). Antibiotic Therapy of Infections due to *Pseudomonas aeruginosa* in Normal and Granulocytopenic Mice: Comparison of Murine and Human Pharmacokinetics. *J. Infect. Dis.* 153:90-97.
120. Drusano G L (1988). Role of Pharmacokinetics in the Outcome of Infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32:289-297.
121. Goodell W and Tomasz A (1980). Alteration of *Escherichia coli* Murein during Amino Acid Starvation. *J. Bacteriol.* 144:1009-16.
122. Tuomanen E and Schwartz J (1987). Penicillin-Binding Protein 7 and its Relationship to Lysis of Nongrowing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169:4912-4915.
123. Tuomanen E; Cozens R; Gilbert K; Zak O and Tomasz A (1986). Phenotypic Tolerance to Beta-Lactam Antibiotics: Modification of Peptidoglycan Structure as a Function of Reduction of Growth Rate (abstract no. 109). In: *Proceedings of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology*. Washington, DC: American Society for Microbiology.
124. Spratt B G (1983). Penicillin-Binding Proteins and the Future of Beta-Lactam Antibiotics. *J. Gen. Microbiol.* 129:1247-60.
125. Inouye S; Tsuruoka T; Goi H et al (1984). Structure-Activity Relationships of the Terminal D-aminoacid Moiety of a Novel Cephamycin in MT-141. *Antibiotics* 11:1403-13.
126. Tsuruoka T; Tamura A; Miyata A et al (1985). Second Lytic Target of Beta-Lactam Compounds that have a Terminal D-aminoacid Residue. *Eur. J. Biochem.* 151:209-16.
127. Inouye S; Goi H; Watanabe T et al (1984). In Vitro and In

Vivo Antibacterial Activities of MT-141, a New Semisynthetic Cephamicin, Compared With Those of Five Cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26:722-29.

128. Kasai T; Hara T; Tamura A et al (1985). In Vitro and In Vivo Activities of a Novel Cephamicin MT-141 against the *Bacteroides fragilis* Group in Comparison With Six Cephem Antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 15:701-14.

129. Goi H; Watanabe T; Miyauchi K et al (1985). Comparative Bactericidal and Morphological Effects of Five Cephamicins on Cells of Three Gram Negative Bacilli at Decreasing Drug Concentrations. *Drug Exp. Res.* 11:771-80.

130. Lindsey N J and Riely P E (1981). In Vitro Antibiotic Removal and Bacterial Recovery from Blood With an Antibiotic Removal Device. *J. Clin. Microbiol.* 78:853.

131. Watanabe T; Kazuno Y; Hirano F et al (1985). Comparative In Vitro and Vivo Activity of Cefminox (MT-141) Cefotaxime and Cefaparazone against Gram Negative Bacteria. *Drugs Exp. Clin. Res.* 11:781-6.

132. Watanabe T; Kazuno Y; Kawaharajo K et al (1984). In Vivo Antibacterial Activity of a Novel Cephamicin (MT-141) on Gram Negative Infections in Mice. *Drugs Exptl. Clin. Res.* X5:293-302.

133. Kawaguchi H; Nakayama I; Akieda Y et al (1983). Comparative Pharmacokinetic Study of Cephamicin Antibiotic, MT-141, Cefoxitin, Cefmetazole and Cefbuperazone. 13th International Congress of Chemotherapy.

134. Nakawaga K; Saito A and Mashimo K (1983). Human Pharmacokinetics of MT-141, a New Cephamicin Antibiotic after Parenteral Administration. 13th International Congress of Chemotherapy.

135. Kamiya I; Nishio M; Murata S et al (1984). A Novel Method to Predict the Elimination Half-Lives and the Renal Excretion Mechanisms of Cephalosporins. *J. Pharm. Dyn.* 7:545-555.

136. Gilbert D N; Beam T R and Kunin C M (1990). The Implications for Europe of Revised FDA Guidelines for Clinical Trials With Anti-Infective Agents. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9:552-8.

137. Martínez Beltrán J; Loza E; Ródenas E et al (1990). Cefminox

- (MT-141): Comparative Activity With Other Cephamicins Against Bacteriemic Isolated. Abstracts of the 30th ICAAC (Atlanta).
138. Soriano F; Edwards R and Greenwood D (1992). Effect of Inoculum Size on Bacteriolytic Activity of Cefminox and Four other Betalactam Antibiotics Against *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:223-226.
139. Soriano F; Edwards R and Greenwood D (1991). Inoculum Effect and Bacteriolytic Activity of Cefminox and Four other Betalactam Antibiotics on *Escherichia coli*. Abstracts of the 17th International Congress of Chemotherapy (Berlin).
140. Soriano F; Edwards R and Greenwood D (1991). Comparative Susceptibility of Cefminox and Cefoxitin to Betalactamases of *Bacteroides* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* 28:55-60.
141. Edwards R; Soriano F and Greenwood D (1991). Breakdown of Beta-Lactam Compounds by Beta-Lactamases from Sensitive *Escherichia coli* Strains. Congress of the Pathological Society of Great Britain and Ireland.
142. Soriano F; Avilés P and Aguilar L (1991). Influence of Human Serum (HS) on the Bactericidal Activity of Betalactam Antibiotics. Abstracts of the 5th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Oslo, Norway). Poster Presentation 1316.
- 142b. Soriano F and Avilés P (1993). High Inoculum Sizes of *E.coli* Impair the Bactericidal Activity of Third Generation Cephalosporins but do not Affect Cefamicins. Abstracts of the 18th International Congress of Chemotherapy (Stockholm, Sweden): p.294. Poster no.1032.
143. Martín M M; Fuentes F; Izquierdo J; Mínguez F y Gómez Lus M L (1992). Consumo de Cefminox Frente a *E.coli*, *B.fragilis* y la Asociación *B.fragilis-E.coli*. *Rev. Esp. Quimioterap.* 5:69-72.
144. Esteban C; Ibáñez C; Macia M A y Aguilar L (1990). Estudio en Voluntarios Sanos de la Disociación Farmacocinética y Farmacodinámica de una Nueva Cefalosporina: Cefminox. *Rev. Farmacol. Clin. y Exp.* 7 (Supp.2):110.
145. Aguilar L; Esteban C; Frías J; Balcabao I P; Carcas A and Dal-Ré R (1993). Cefminox In Vitro Susceptibility, In Vivo Pharmacokinetics and Ex Vivo Serum Bactericidal Activity:

Correlations in Healthy Volunteers. *J. Antimicrob. Chemother.* (en prensa).

146. National Committee for Clinical Laboratory Standards (1988). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*. 2nd ed; Tentative Standard. NCCLS. Document M7-T2. Villanova, Pa.: NCCLS.

147. National Committee for Clinical Laboratory Standards (1985). *Alternative Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Proposed Guideline*. NCCLS publication. Document M17-P. Villanova, Pa.: NCCLS.

148. Beerenbaum M C (1978). A Method for Testing for Synergy With Any Number of Agents. *J. Infect. Dis.* 137:122-30.

149. National Committee for Clinical Laboratory Standards (1987). *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents: Proposed Guideline*. NCCLS Document M26-P. NCCLS, Villanova, Pennsylvania.

150. Mínguez F; Gómez Lus M L; Muro A et al (1989). Comparative Study of the Postantibiotic Effect of Cefotaxime and Perfloracin. *Rev. Infect. Dis.* 11 (Supp.5):955-957.

151. Mackinstosh I P; O'Grady F; Greenwood D et al (1973). A Twelve Channel Bacterial Growth Monitoring System. *Biomedical Engineering* 8:514-5 & 526.

152. Eley A and Greenwood D (1986). Beta-lactamases of Type Culture Strains of the *Bacteroides fragilis* Group and of Strains that Hydrolyse Cefoxitin, Latamoxef and Imipenem. *J. Med. Microbiol.* 21:49-57.

153. Shinkai S; Owawa T and Fujita M (1984). The Studies on Assays Methods of MT-141 Levels in Biological Fluids. *Chemotherapy* 32 (Supp. 5):59-66.

154. National Committee for Clinical Laboratory Standards (1987). *Methodology for the Serum Bactericidal Test; Proposed Guidelines*. NCCLS Document M21-P, vol 7, p. 7-19. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova Pa.

155. Corrales I; Mato R; Barrientos S; Gómez Lus M L and Prieto J (1992). Interaction of Azithromycin with Microbicidal Function of Neutrophils and Macrophages. *J. Drugs Develop.* 5:5-11.

156. van der Auwera P and Husson M (1989). Influence of

Antibiotics on Movility and Adherence of Human Neutrophils Studied in vitro. *Drugs Exp. Clin. Res.* 15:211-218.

157. Rodríguez A B; Pariente J; Prieto J and Barriga C (1987). Effects of Cefmetazol, Cefoxitin and Imipenem on Polymorphonuclear Leukocytes. *Gen. Pharm.* 18:613-613.

158. Mínguez F; Gómez Lus M L; Muro A et al (1989). Comparative Study of the Post-Antibiotic Effect of Cefotaxime and Pefloxacin. *Rev. Infect. Dis.* 11:955-957.

159. Soriano F; Santamaría M; Ponte C et al (1988). In Vivo Significance of the Inoculum Effect of Antibiotics on *Escherichia coli*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 7:410-412.

160. Eley A and Greenwood D (1986). Characterization of Beta-lactamases in Clinical Isolates of *Bacteroides*. *J. Antimicrob. Chemother.* 18:325-333.

161. Ferrante A and Thong Y H (1980). Optimal Conditions for the Simultaneous Purification of Mononuclear and Polymorphonuclear Leukocytes From Human Blood by the Hypaque Ficoll Method. *J. Immunol. Meth.* 36:109-117.

162. Smith Kline & French, S.A.E. (1990). Cefminox Report. Serum Protein Binding p.63-65.

163. Bakker-Woudenberg I A; van der Berg J C; Vree T B; Baars A M and Michel M F (1985). Relevance of Serum Protein Binding of Cefoxitin and Cefazolin to Their Activities Against *Klebsiella pneumoniae* Pneumonia in Rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28:654-659.

164. Hakim L; Bourne D W and Triggs E J (1989). Disposition of Cefotaxime and its Metabolite, Desacetylcefotaxime, in Rat: Application of a Pharmacokinetic-Protein Binding Model. *Xenobiotica.* 19:743-754.

165. Komiya I; Matsushita K and Nishio M (1984). Distribution of MT-141 to the Genital Organ and Other Main Organs in Female Rats. Meiji Seika Kaisha Ltd.

166. Landau Z; Rubinstein E and Halkin H (1980). Interstitial Fluid Concentrations of Cefoxitin, Cephalosporin and Cefamandole. *J. Antimicrob. Chemother.* 6:657-663.

167. Fujita K; Fujita H M; Hata M et al (1983). Cefotaxime Concentration in Serum and Kidney. *Japanese Journal of*

Antibiotics. 36:1461-1464.

168. Nakawaga K; Koyama M; Miyazaki M and Tokyo S (1984). Phase I Clinical Study on MT-141. *Chemotherapy* 32 (Supp 5):104-113.

169. Thrupp L D; Cleeland R; Jones R N et al (1992). General Guidelines for Clinical Bacteriology. *Clin. Infect. Dis.* 15 (Sup. 1):339-346.

170. Beam T R; Gilbert D N and Kunin C M (1992). General Guidelines for the Clinical Evaluation of Anti-Infective Drug Products. *Clin. Infect. Dis.* 15 (Sup. 1):5-32.

171. European Guidelines for the Clinical Evaluation of Anti-Infective Drug Products (1993). Beam T R; Gilbert D N and Kunin C M, with modifications by a European Working Party (Eds.). *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.*

172. Mattie H (1981). Kinetics of Antimicrobial Action. *Rev. Infect. Dis.* 3:19-27.

173. Drusano G L; Johnson D E; Rosen M and Standiford H C (1993). Pharmacodynamics of a Fluoroquinolone Antimicrobial Agent in a Neutropenic Rat Model of Pseudomonas Sepsis. *Antimicrob. Agent Chemother.* 37:483-490.

174. Lorian V and DeFreitas C C (1979). Minimal Antibiotic Concentrations of Aminoglycosides and Beta-Lactam Antibiotics for Some Gram-Negative Bacilli and Gram-Positive Cocci. *J. Infect. Dis.* 139:599-603.

175. Anwar H and Costerton J W (1992). Effective Use of Antibiotics in the Treatment of Biofilm-Associated Infections. *ASM News* 58:665-668.

176. Kunin C (1981). Dosage Schedules of Antimicrobial Agents: A Historical Review. *Rev. Infect. Dis.* 3:4-11.

177. Solomkin J S; Hemsell D L; Sweet R et al (1992). Evaluation of New Anti-Infective Drugs for the Treatment of Intraabdominal Infections. *Clin. Infect. Dis.* 15 (Sup. 1):33-42.

178. Gorbach S L; Condon R E; Conte J E et al (1992). Evaluation of New Anti-Infective Drugs for Surgical Prophylaxis. *Clin. Infect. Dis.* 15 (Sup. 1):313-338.

179. Goldstein E J C; Citron D M and Cherubin C E (1991). Comparison of the Inoculum Effects of Members of the Family

Enterobacteriaceae on Cefoxitin and Other Cephalosporins, Beta-Lactamase Inhibitor Combinations, and the Penicillin-Derived Components of these Combinations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:560-566.

180. Backes R J; Rouse M S; Henry N K et al (1986). Activity of Penicillin Combined with an Aminoglycoside Against Group B Streptococci "In Vitro" and in Experimental Endocarditis. *J. Antimicrob. Chemother.* 18:491-498.

181. Soriano F (1992). Optimal Dosage of Beta-Lactam Antibiotics: Time Above the MIC and Inoculum Effect. *J. Antimicrob. Chemother.* 30:566-569.

182. National Committee Clinical Laboratory Standard (1992). Development of "In Vitro" Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters (2nd edition). Tentative Guidelines. NCCLS Document M23-T2.

183. Goto S; Tsuji A; Ogawa M et al (1984). Fundamental Studies On MT-141, a New Cefamycin. *Chemotherapy* 32 (Suppl. 5):17-33.

184. National Committee Clinical Laboratory Standard (1989). Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents. NCCLS Document M26. Approved Standard. Villanova, Pennsylvania.

185. Gerdin D N; Peterson L R; Moody J A and Fasching C E (1985). Mezlocillin, Ceftizoxime, and Amikacin Alone and in Combination Against Six Enterobacteriaceae in a Neutropenic Site in Rabbits. *J. Antimicrob. Chemother.* 15 (Suppl A):207-219.

186. Dutcher B S; Reynard A M; Beck M E and Cunningham R K (1978). Potentiation of Antibiotic Bactericidal Activity by Normal Human Serum. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13:820-826.

187. Kawaharajo K; Shitoh K; Niizeki M; et al (1984). Therapeutic Efficacy of a New Cephamycin MT-141, in Compromised Mice. *The Journal of Antibiotics* 12:1703-1711.

188. Lorian V and Gemmell C G (1991). Effect of Low Antibiotic Concentrations on Bacteria: Effects on Ultrastructure, Virulence, and Susceptibility to Immunodefenses. Chapter 14. In: *Antibiotics in Laboratory Medicine, Third Edition* (Lorian V, Ed.). Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA.

189. Lorian V (1989). In Vitro Simulation of In Vivo Conditions,

Physical State of the Culture Medium. *J. Clin. Microbiol.* 27:2403-2407.

190. Tsuruoka T; Yamada Y; Goi H et al (1985). The Bacteriolytic Action of MT-141, a New Cephamycin Antibiotic, on Gram Negative Bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 15:159-171.

191. Kubitschek H E and Woldringh C L (1983). Cell Elongation and Division Probability During the *Escherichia coli* Growth Cycle. *J. Bacteriol.* 153:1379-1387.

192. Lorian V and Atkinson B (1984). Bactericidal Effect of Polymorphonuclear Neutrophils on Antibiotic Induced Filaments of Gram Negative Bacteria. *J. Infect. Dis.* 149:719-727.

193. Tuomanen E and Tomasz A (1984). Protection by D-Amino Acids Against Growth Inhibition and Lysis Caused by Beta-Lactam Antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26:414-416.

194. Lorian V (1985). Effect of Low Concentrations on Bacteria. In: Lorian V (Ed): *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 596-668.

195. Amsterdam D (1992). The MIC: Myth and Reality. *The Antimicrobial Newsletter* 8:9-16.

196. Lorian V (1980). Effects of Subminimum Inhibitory Concentrations of Antibiotics on Bacteria. In: Lorian V (Ed): *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 442-448.

197. Hurley J C (1992). Antibiotic-Induced Release of Endotoxin: a Reappraisal. *Clin. Infect. Dis.* 15:840-854.

198. Hurley J C (1993). Reappraisal of the Role of Endotoxin in the Sepsis Syndrome. *Lancet* 341:1133-1135.

199. Grasso S; Meinardi G; DeCarneri I and Tamassia V (1978). New In Vitro Model to Study the Effect of Antibiotic Concentrations and Rate of Elimination on Antibacterial Activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13:570.

200. Mínguez F y Prieto J (1993). Efecto Postantibiótico. *Enf. Inf. y Microbiol. Clin.* 11:147-155.

201. Watanabe S and Omoto S (1990). Pharmacology of Cefminox, a New Bactericidal Cephamycin. *Drugs Exptl. Clin. Res.* XVI:461-467.

202. Goi H; Inouye S and Kitasato I (1989). Bacteriolytic Combination Effect of Cefminox and Piperacillin Evaluated by

- Turbidimetry. *Drugs Exptl. Clin. Res.* XV:397-407.
203. Sanders C C and Sanders W E (1983). Emergence of Resistance During Therapy With the Newer Betalactam Antibiotics: Role of Inducible Betalactamases and Implications for the Future. *Rev. Infect. Dis.* 5:693.
204. Grimm H (1982). Bacteriological Antagonism Between Acylureidopenicillins and Cephalosporins. *J. Antimicrob. Chemother.* 9 (Supp. A):31.
205. Sweet R L; Bartlett J G; Hemsell D L; Solomkin J S and Tally F (1992). Evaluation of New Antiinfective Drugs for the Treatment of Acute Pelvil Inflammatory Disease. *Clin. Infect. Dis.* 15 (Supp. 1):53-61.
206. Tomono N; Chiba F; Sakurai T et al (1984). Pharmacokinetics of MT-141 (I). Serum Levels and Urinary Excretions. *Chemotherapy* 32 (Supp. 5):67-75.
207. Nakayama I; Akiada Y; Kawamura H et al (1984). Studies on MT-141 a New Cephamycin Antibiotic. Activity, Absorption, Excretion, Metabolism, Tissue Distribution and its Clinical Application in Surgery. *Chemotherapy* 32 (Supp. 5):319-337.
208. Ducher B S; Reymard A M; Beck M E and Cunnigham R K (1978). Potentiation of Antibiotic Bactericidal Activity by Normal Human Serum. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13:820-826.
209. Pien F D; Williams R D and Vosti K L (1975). Comparison of Broth and Human Serum as the Diluent in the Serum Bactericidal Test. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7:113-114.
210. Leggett J E; Wolz S A and Craig W A (1989). Use of Serum Ultrafiltrate in the Serum Dilution Test. *J. Infec. Dis.* 160:616-623.
211. Craig W A and Suh B (1986). Protein Binding and Antimicrobial Effects: Methods for the Determination of Protein Binding. In: Lorian V (Ed): *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 2nd ed. p. 477-514. Williams & Wilkings Co, Baltimore.
212. Fernández M L (1993). Otro Vistazo a la Actividad Bactericida del Suero. *Enf. Infec. y Microbiol. Clin.* 11:1-3.
213. Potter B J; Trueman A M and Jones E A (1973). Serum Complement in Chronic Liver Disease. *Gut* 14:451-456.
214. Rimola A; Soto R; Bory F et al (1984). Reticuloendothelial

System Phagocytic Activity in Cirrhosis and its Relation to Bacterial Infections and Prognosis. *Hepatology* 4:53-58.

215. Feliú E; Gougerot M A; Hakin J et al (1977). Blood Polymorphonuclear Dysfunction in Patients with Alcoholic Cirrhosis. *Eur. J. Clin. Invest.* 7:571-577.

216. Gillissen G et Pusztai-Markos Z (1984). Evaluation des Effects Modulateurs des Antibiotiques In Vivo sur la Phagocytose Chez la Souris Utilisant des Methodes Differentes. *Pathologie Biologie* 32:355-358.

217. Ito K; Hayasaki M and Tamaya T (1990). Pharmacokinetics of Cephem Antibiotics in Exudate of Pelvic Retroperitoneal Space after Radical Hysterectomy and Pelvic Lymphadenectomy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:1160-1164.

218. Fry D E (1988). Antibiotics in Surgery. An Overview. *Am. J. Surg.* 31:11-15.

219. Norrby S (1990). The Design of Clinical Trials with Antibiotics. *Eur. Clin. Microbiol. Infec. Dis.* 9:523-529.

220. Huizinga W K J; Baker L W; Kadwa H et al (1988). Management of Severe Intraabdominal Sepsis. *Br. J. Surg.* 75:1134-1138.

221. Di Piro J T; Welage L S; Levine B A et al (1989). Single-Dose Cefmetazole versus Multiple-Dose Cefoxitin for Prophylaxis in Abdominal Surgery. *J. Antimicrob. Chemother.* 23 (Supp. D):71-77.

222. Burnakis T and Hildebrandt N (1986). Pelvic Inflammatory Disease: A Review with Emphasis on Antimicrobial Therapy. *Rev. Infec. Dis.* 1:86-90.

223. Soper D and Despres B (1988). A Comparison of Two Antibiotic Regimens for Treatment of Pelvic Inflammatory Disease. *Obstret. Gynecol.* 72:7-12.

224. Felisart J; Rimola A; Arroyo V et al (1985). Cefotaxime is More Effective than is Ampicillin-Tobramycin in Cirrhotics with Severe Infections. *Hepatology* 5:457-462.

225. Pocock S (1987). *Clinical Trials*. New York, John Willey & Sons. p.124-127.

VIII. TABLAS

TABLA 1. DESARROLLO POST-TOXICOLOGICO Y PRE-TERAPEUTICO
ESTUDIOS MICROBIOLOGICOS

CENTRO	INVESTIGADORES	ESTUDIOS	CITA BIBL.
Servicio de Microbiología Hospital Ramón y Cajal Universidad Autónoma Madrid. España	Martínez Beltrán, J. Loza, E. Baquero, F.	1. Actividad Inhibitoria 2. Actividad frente a cepas productoras de betalactamasas caracterizadas 3. Efecto de la Mutación OmpF ⁻	137 137 137
Department of Microbiology and PHLS Laboratory University Hospital Queen's Medical Centre Nottingham. United Kingdom	Soriano, F. Edwards, R. Greenwood, D.	4. Actividad Bacteriolítica 5. Efecto Inóculo 6. Susceptibilidad de Cefminox a betalactamasa Bacteroides spp y E.coli	138, 139 138, 139 140, 141
Depto. de Microbiología Fundación Jiménez Díaz Universidad Autónoma Madrid. España	Soriano, F. Avilés, P. Aguilar, L.	7. Actividad Bactericida 8. Efecto del Suero Humano 9. Modelo Animal Discriminativo	142, 142b 142 73
Depto. de Microbiología Facultad de Medicina Universidad Complutense Madrid. España	Prieto, J. Gómez Lus, M. Mínguez, F.	10. Actividad frente a Bacteroides grupo fragilis 11. Efecto Post-Antibiótico 12. Consumo In Vitro de Cefminox 13. Interacción In Vitro con otros Antibióticos	- - 143 -

TABLA 2. DESARROLLO POST-TOXICOLOGICO Y PRE-TERAPEUTICO

(a) ESTUDIOS CLINICOS: FASE I

CENTRO	INVESTIGADORES	ESTUDIOS	CITA BIBL.
Depto. de Farmacología Hospital La Paz Unidad de Farmacología Facultad de Medicina Universidad Autónoma Madrid. España	Frías, J. Esteban, C. Carcas, A. Aguilar, L.	14. Fase I: Farmacocinética (Niveles HPLC, Seguridad y Tolerancia)	144, 145
Depto. de Microbiología Hospital M.C. Gómez Ulla Universidad Complutense Madrid. España	Pérez Balcabao, I. Aguilar, L.	15. Fase I: Farmacodinamia (Actividad Bactericida Sérica y Niveles Bioensayo)	144,145
Depto. de Microbiología Facultad de Medicina Universidad Complutense Madrid. España	Prieto, J. Corrales, I. Aguilar, L.	16. Fase I: Inmunomodulación (Efecto Sobre Funciones Polimorfonucleares)	10, 10b

(b) COORDINACION DEL PROGRAMA

Depto. de Investigación Clínica. SmithKline Beecham Pharmaceuticals. Madrid. España	- Dal-Ré, R. - Aguilar, L. - Coronel, P.	- Gerencia, Coordinación. - Diseño: Programa y E.C. Elaboración de Informes. - Monitorización.	Reuniones: SB/MEIJI-SEIKA ---
--	--	---	---

TABLA 3. ANTIBIOTICOS UTILIZADOS EN EL DESARROLLO PRE-TERAPEUTICO DE CEFMINOX

ESTUDIO N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
AMPICILINA									X							
PIPERACILINA									X							
CEFOXITINA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
CEFOTETAM	X	X	X													
CEFMINOX	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CEFUROXIMA									X							
CEFOTAXIMA	X	X	X	X	X		X	X	X							
CEFTIZOXIMA				X	X		X	X								
CEFPIROME	X															
CEFTAZIDIMA		X	X										X			
AZTREONAM	X	X	X						X							
IMIPENEM				X	X		X	X								
CLINDAMICINA										X						
METRONIDAZOL										X						
AMIKACINA													X			

TABLA 7. MEDIOS DE CULTIVO BACTERIANO UTILIZADOS

MEDIOS	ESTUDIOS														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	15	
AGAR:															
- Mueller Hinton	a	X	X		X		X	X			X	X	X	X	
- Brain Heart						f									
- Wilkins Chalgren (*)										X				X	
CALDO:															
- Mueller Hinton	b c				X		X	X g	X		X			c	
- Tioglicolato										h					
- Brucella					e		e	e g							
- Wilkins Chalgren												X		X	
- Schaedler (*)					X		X	X g							
- Medio Completo				d											

(*) Para bacterias anaerobias, o cultivos mixtos en su caso, con incubación en anaerobiosis.

a. Para determinar la susceptibilidad en *Haemophilus* spp, se suplementó con 5% de sangre lacada de oveja, incubándose en atmósfera del 10% de CO₂.

b. Para determinar la susceptibilidad de *Streptococcus viridans*, se suplementó con 3% de sangre de caballo lisada.

c. Suplementado con Ca⁺⁺(30 mg/L) y Mg⁺⁺(25 mg/L).

d. Cita bibliográfica 81.

e. Enriquecido con hemina y carbonato sódico para testar Imipenem frente a *B. fragilis* en atmósfera de anaerobiosis.

f. Suplementado con extracto de levadura (5 gr/L), hemina (5 mg/L) y menadiano (1 mg/L).

g. Con y sin 10% de suero humano.

h. Suplementado con vitamina K y hemina.

TABLA 8. ACTIVIDAD INHIBITORIA "IN VITRO" DE CEFMINOX

ORGANISMOS (N° de aislados)	CMI (mcg/ml)		
	RANGO	CMI ₅₀	CMI ₉₀
E. coli (88)	0.03 - 8.00	0.2	0.5
K. pneumoniae (56)	0.10 - 2.00	0.2	0.5
K. oxytoca (18)	0.10 - 0.50	0.2	0.5
P. mirabilis (30)	0.20 - 0.50	0.5	0.5
P. vulgaris (4)	0.50 - 1.00		
S. typhi (13)	0.10 - 0.50	0.2	0.5
Salmonella spp. (45)	0.10 - 1.00	0.5	0.5
Y. enterocolitica (5)	0.50 - 4.00		
E. aerogenes (12)	4.00 - >128	128	128
E. cloacae (48)	2.00 - >128	128	128
E. agglomerans (5)	1.00 - 4.00		
C. freundii (23)	1.00 - >128	64	128
S. marcescens (54)	1.00 - >128	8	32
M. morgani (26)	1.00 - 128	2	16
Providencia spp. (4)	0.20 - 8.00		
P. aeruginosa (47)	256 - >512	512	512
Pseudomonas spp. (6)	256 - 256		
X. maltophilia (5)	64 - 256		
A. calcoaceticus (44)	8.00 - >512	64	256
H. influenzae Beta-Lact (-) (25)	0.50 - 2.00	1	2
H. influenzae Beta-Lact (+) (20)	1.00 - 2.00	1	2
H. influenzae NBLP Ap' (7)	0.50 - 4.00		

ORGANISMOS (Nº de aislados)	CMI (mcg/ml)		
	RANGO	CMI ₅₀	CMI ₉₀
<i>S. viridans</i> pen-s (35)	0.06 - 32	1	8
<i>S. viridans</i> pen-i (14)	1.00 - 32	8	32
<i>S. viridans</i> pen-r (11)	8.00 - >32	16	>32
<i>S. pneumoniae</i> pen-s (28)	≤0.01 - 2.00	0.2	2
<i>S. pneumoniae</i> pen-i (9)	0.20 - 32		
<i>S. pneumoniae</i> pen-r (7)	32 - >32		
<i>E. faecalis</i> (26)	8.00 - 64	32	64
<i>E. faecium</i> (12)	4.00 - >128	64	128
<i>S. aureus</i> met-s (40)	16 - 32	16	16
<i>S. aureus</i> met-r (30)	256 - >256	>256	>256
<i>S. epidermidis</i> met-s (30)	8.00 - 32	16	32
<i>S. epidermidis</i> met-r (30)	128 - >256	128	>256
<i>B. fragilis</i> (35)	0.50 - 64	0.5	2
<i>B. fragilis</i> , grupo (25)	1.00 - 64	1	16
<i>C. perfringens</i> (30)	≤0.01 - 0.2	0.03	0.06

Tomada del póster correspondiente a la cita bibliográfica 137 (Martínez Beltrán, J.; Loza, E.; Ródenas, E.; Catalán, P.; Cantón, R.; García Marcos, J. and Baquero, F., 1990)

TABLA 9. SUSCEPTIBILIDAD DE BACTEROIDES GRUPO FRAGILIS (%)

CONCENTRACION (mcg/ml)	CMX	CFX
2	42	0
4	54	0
8	58	22
16	62	32
32	66	78
64	74	82
128	100	100
CMI ₅₀	4 mcg/ml	32 mcg/ml

Considerando "breakpoint" de 16 mcg/ml, el 50% de las cepas resistentes a Cefoxitina son sensibles a Cefminox.

Tomada del estudio número 10.

TABLA 10 A. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE CEFMINOX

ORGANISMOS	CMI ₅₀	CMI ₉₀
C. freundii	32	128
E. coli	0.5	1
Enterobacter spp	125	125
K. oxitoca	4	2
K. pneumoniae	0.5	1
P. rettgeri	0.5	2

TABLA 10 B. INDICES DE INTERACCIÓN DE CEFMINOX CON CEFTAZIDIMA Y AMIKACINA

Nº AISLADOS	COMBINACION	SINERGIA	INDIFERENCIA	ANTAGONISMO
32	CMX/CTD	---	100%	---
32	CMX/AMK	93%	7%	---

Tomadas del estudio número 13.

TABLA 11. PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS DE SUSCEPTIBILIDAD (mcg/ml)

E.coli ATCC 25922	(1)		CMI _{50%} (2)			CMI (3)(4)		CMI (1)			(3)		(5)		CLM (6)	
	CMA	RANGO	MODA	Conv.	IG	MC	MCIG	CMI _r	CMB	CMB _{90%}	30%	75%	90%			
CMX	0.5	-	-	1	2	2	2	1	2	8	0.5	0.5	1			
CFX	1	1-4	2-4	2	2	8	8	4	2	-	2	4	8			
CTZ	0.03	0.03-0.12	-	0.12	4	0.12	4	0.12	0.12	-	1	2	INV			
CTX	0.015	0.06-0.25	<0.12	0.03	2	0.12	2	0.12	0.03	-	1	2	INV			
IMP	0.06	0.06-0.25	-	0.12	0.5	0.25	1	0.25	0.25	-	1	2	INV			
CFU	-	2-8	2	4	16	-	-	-	-	-	-	-	-			
AMP	-	2-8	2	4	8	-	-	-	-	-	-	-	-			
PIP	-	1-4	1	2	256	-	-	-	-	-	-	-	-			
AZT	-	0.06-0.25	-	0.12	128	-	-	-	-	-	-	-	-			
<i>B.fragilis</i> ATCC 25285																
CMX				0.5					0.5	4						
CFX				2					2							
CTZ				2					2							
CTX				4					8							
IMP				4					8							
<i>K.pneumoniae</i> ATCC 13883																
CMX				0.5					1	1						
<i>S.marcescens</i> ATCC 8100																
CMX				8					16	4						

INV. Inviabile

Tomado del estudio: (1) número 4, (3) número 7, (4) número 5, (5) número 15, (6) Determinadas a partir de los datos del estudio número 4.

(2). NCCLS 1990. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically. 2nd ed. Document M7-A2. Villanova, Pennsylvania.

TABLA 12. ESCHERICHIA COLI ATCC 25922 INCUBADA CON 8, 4 Y 2 mcg/ml DE CADA ANTIBIÓTICO

MEDIA \pm SDlog ₁₀ ufc/ml sin suero humano / MEDIA \pm SDlog ₁₀ con 10% de suero humano			
TIEMPO DE INCUBACION 6 h.			
CONCENTRACION ANTIBIOTICA (mcg/ml)	8	4	2
CTZ	2.00 \pm 0.47/2.26 \pm 0.19	1.87 \pm 0.30/2.14 \pm 0.07	2.51 \pm 0.11/2.65 \pm 0.06
CTX	3.39 \pm 0.16/3.35 \pm 0.15	3.36 \pm 0.22/3.41 \pm 0.19	3.99 \pm 0.26/4.00 \pm 0.15
CFX	3.11 \pm 0.29/2.63 \pm 0.27	3.68 \pm 0.25/3.25 \pm 0.20	4.34 \pm 0.11/3.94 \pm 0.22
CMX	2.22 \pm 0.32/2.82 \pm 0.29	2.34 \pm 0.30/2.18 \pm 0.06	2.83 \pm 0.33/3.01 \pm 0.21
IMP	1.82 \pm 0.15/1.51 \pm 0.16	1.90 \pm 0.20/1.36 \pm 0.42	2.56 \pm 0.23/1.84 \pm 0.66

Tomada del póster correspondiente a la cita bibliográfica 142 (Soriano, F.; Avilés, P. y Aguilar, L., 1991).

TABLA 13. DISMINUCIÓN A LAS 6 HORAS DEL INÓCULO INICIAL (EN NÚMERO ABSOLUTO/UNIDADES LOGARÍTMICAS) TRAS EXPOSICIÓN A DISTINTAS CONCENTRACIONES ANTIBIÓTICAS

ANTIBIOTICO	CMI(a)/CMI(b)	CONCENTRACIONES (mcg/ml)		
		8	4	2
CTZ	0.12/0.12	$5 \times 10^4/4.7$	$6.3 \times 10^4/4.8$	$1.5 \times 10^4/4.2$
CTX	0.03/0.12	$2 \times 10^3/3.3$	$2 \times 10^3/3.3$	$5 \times 10^2/2.7$
CFX	2/8	$4 \times 10^3/3.6$	$10^3/3.0$	$2.5 \times 10^2/2.4$
CMX	1/2	$3 \times 10^4/4.5$	$2.5 \times 10^4/4.4$	$8 \times 10^3/3.9$
IMP	0.12/0.25	$8 \times 10^4/4.9$	$6.3 \times 10^4/4.8$	$1.3 \times 10^4/4.1$

a. CMI realizada en caldo Mueller-Hinton. Inóculo estándar.

b. CMI realizada en medio completo. Inóculo estándar.

Construida a partir de los datos del estudio número 7.

TABLA 14. TASAS DE MUERTE ENTRE 0 Y 3 HORAS

	CMX	CFX	CTX	CTZ
CMI (1)	1	2	0.03	0.12
(2)	2	2	2	2-4
KR (1)	-1.0 ± 0.1 ^a	-1.1 ± 0.0 ^a	-0.6 ± 0.0 ^b	-0.7 ± 0.1 ^b
(2)	-0.7 ± 0.1 ^a	-1.0 ± 0.1 ^a	-0.2 ± 0.1 ^b	-0.4 ± 0.0 ^b

a. No significativo; b. $p \leq 0.05$

(1) inóculo: 10^5 ufc/ml

(2) inóculo: 5×10^7 ufc/ml

Tomada de la cita bibliográfica 142b (Soriano, F. y Avilés, P., 1993)

TABLA 15. BACTEROIDES FRAGILIS ATCC 25285 INCUBADO CON 8 mcg/ml DE CADA ANTIBIÓTICO

MEDIA \pm SDlog ₁₀ ufc/ml sin suero humano / MEDIA \pm SDlog ₁₀ ufc/ml con 10% de suero humano		
TIEMPO DE INCUBACION	6 h.	24 h.
CTZ	5.24 \pm 0.44/4.93 \pm 0.25	1.96 \pm 0.17/2.43 \pm 0.43
CTX	3.66 \pm 0.34/4.38 \pm 0.17	2.22 \pm 0.28/1.55 \pm 0.20
CFX	5.04 \pm 0.39/4.22 \pm 0.22	2.26 \pm 0.40/1.77 \pm 0.26
CMX	4.57 \pm 0.10/4.00 \pm 0.06 (*)	(*) 2.12 \pm 0.09/<1 (*)
IMP	3.30 \pm 0.26/3.55 \pm 0.38	1.22 \pm 0.22/1.07 \pm 0.07

(*) p<0.05 Test no paramétrico de Mann-Whitney

Tomada del póster correspondiente a la cita bibliográfica 142 (Soriano, F.; Avilés, P. y Aguilar, L., 1991)

TABLA 16 A. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DE CEFMINOX (CMX) FRENTE A CULTIVOS PUROS Y MIXTOS DE S.AUREUS, E.COLI Y B.FRAGILIS

Microorganismos	CMI (mg/l)
E. coli	1
S. aureus	16
B. fragilis	0.5
E. coli + B. fragilis	2

TABLA 16 B. EFECTO POSTANTIBIÓTICO DE CEFMINOX SOBRE S.AUREUS, E.COLI Y E.COLI + B.FRAGILIS

Microorganismo	Concentración (mg/l)	PAE (horas) + e.s.
S. aureus	16	0.4 ± 0.1
"	160	1.2 ± 0.4
E. coli	1	0.3 ± 0.2
"	10	1.4 ± 0.5
B. fragilis	0.5	0.4 ± 0.2
"	5	0.9 ± 0.4
"	16	1
"	160	2
B. fragilis + E. coli	2	-0.5 ± 0.5
"	20	0.4 ± 0.2

Tomadas del estudio número 11.

TABLA 17. PORCENTAJE DE REDUCCIÓN A DISTINTAS CONCENTRACIONES ANTIBIÓTICAS

CONCENTRACION (mcg/ml)	CMX	CFX	CTX	CTZ	IMP
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.12	6.1	0.0	0.0	0.0	0.0
0.25	71.4	0.0	0.0	0.0	2.0
0.5	87.7	0.0	12.7	0.0	2.0
1.0	87.7	8.0	57.4	63.0	31.2
2.0	87.7	61.7	72.3	82.9	70.8
4.0	87.7	80.0	72.3	82.9	70.8
8.0	NR	91.4	NR	NR	NR

NR: No realizado

TABLA 18. CONCENTRACIÓN LÍTICA MÍNIMA (CLM) PARA DISTINTOS ANTIBIÓTICOS

PARAMETRO	CMX	CFX	CTX	CTZ	IMP
CLM 15%	0.5	2	0.5	1	1
CLM 30%	0.5	2	1	1	1
CLM 45%	0.5	2	1	1	2
CLM 60%	0.5	2	1	1	2
CLM 75%	1	4	2	2	2
CLM 90%	1	8	NP	NP	NP

NP: No es posible la consecución de esta disminución en la densidad óptica

Construidas a partir de los registros turbidimétricos del estudio número 4.

TABLA 19. EVOLUCIÓN DE LA MASA BACTERIANA Y VIABILIDAD A LO LARGO DEL TIEMPO

ANTIBIOTICO	CONCENTRACION		TIEMPO (horas)						
	Unidades CMI	mcg/ml	2		5		20		
			D.O. (%)	ufc/ml	D.O. (%)	ufc/ml	D.O. (%)	ufc/ml	
Control	0	0	90	3x10 ⁹	90	3x10 ⁹	90	3x10 ⁹	
CMX CMI = 1 mcg/ml	0.5	0.5	30	4x10 ⁸	30	4x10 ⁸	90	3x10 ⁹	
	1	1	10	10 ⁷	10	10 ⁷	30	4x10 ⁸	
	2	2	10	10 ⁶	10	10 ⁵	10	10 ⁴	
CMB = 2 mcg/ml	4	4	10	10 ⁶	10	10 ⁵	10	≤10 ²	
CFX CMI = 2 mcg/ml	0.5	1	90	-	90	-	90	-	
	1	2	30	10 ⁸	30	10 ⁷	30	4x10 ⁸	
	2	4	30	6x10 ⁷	30	4x10 ⁶	30	6x10 ⁷	
	4	8	10	4x10 ⁶	10	10 ⁶	10	10 ⁶	
	CMB = 2 mcg/ml	8	16	10	10 ⁶	10	10 ⁶	10	≤10 ²
CTZ CMI = 0.12 mcg/ml	0.5	0.06	90	-	90	-	90	-	
	1	0.12	90	-	90	-	90	-	
	2	0.25	90	4x10 ⁷	90	4x10 ⁷	90	10 ⁹	
	4	0.50	90	4x10 ⁷	90	4x10 ⁷	90	10 ⁹	
	CMB = 0.12 mcg/ml	8	1	30	3x10 ⁶	30	3x10 ⁶	30	3x10 ⁵
	16	2	20	10 ⁶	20	3x10 ⁵	20	10 ⁵	

D.O. Densidad óptica.

- Sin recuento.

Construida a partir de los registros turbidimétricos del estudio número 4.

TABLA 20. MASA CELULAR TRAS LA EXPOSICIÓN ANTIBIÓTICA (DE 2 A 3 H.)

VIABILIDAD	DENSIDAD OPTICA		
	CMX	CFX	CTZ
9×10^9	90	90	90
4×10^8	30	30	90
4×10^7	10	30	90
4×10^6	10	30	30
4×10^5	10	10	20

Construida a partir de los datos del estudio número 4.

TABLA 21. CMI (mcg/ml) DE CMX Y CFX PARA 8 CEPAS DE BACTEROIDES

ORGANISMO	CMI	
	CMX	CFX
B.fragilis 57	32	32
B.fragilis 97	8	16
B.fragilis 107	128	32
B.fragilis 119	32	32
B.fragilis 2013E	8	8
B.fragilis 0423	128	32
B.distasonis R939	64	32
B.thetaiotaomicron 0456	256	128

Tomada de la cita bibliográfica 140 (Soriano, F.; Edwards, R. and Greenwood, D., 1991).

TABLA 22. CONCENTRACIONES SÉRICAS Y AUC PARA LAS DISTINTAS DOSIFICACIONES EN EL MODELO ANIMAL

ANTIBIOTICO	DOSIS (mg)	NIVEL SÉRICO: MEDIA (95% IC)				AUC
		5 min	15 min	30 min	60 min	
AMP	6.0	6.4 (5.8-6.9)	13.9 (6.1-21.6)	14.8 (10.6-18.9)	4.2 (3.9-4.4)	601.8
	15.0	15.5 (6.3-24.6)	38.6 (30.5-46.6)	47.0 (32.1-62.8)	42.4 (26.8-57.9)	2253.5
PIP	10.0	5.9 (3.1-8.6)	25.1 (15.6-34.5)	28.8 (19.6-37.9)	3.8 (2.4-5.2)	1048.3
	50.0	12.6 (9.0-16.3)	28.5 (25.7-31.3)	49.0 (26.0-72.0)	20.6 (11.4-29.0)	1830.8
	150.0	25.0 (13.8-46.3)	53.3 (45.0-61.6)	63.3 (18.3-108.7)	97.3 (29.8-164.7)	3675.0
	300.0	59.0 (18.0-100.0)	73.8 (35.8-111.8)	114.4 (56.9-171.9)	90.2 (48.6-131.8)	5144.5
CFU	2.0	2.7 (0.5-4.9)	6.1 (5.3-6.9)	5.8 (3.3-8.3)	7.0 (5.6-8.3)	325.3
	6.0	17.2 (16.1-18.3)	27.2 (24.7-29.7)	26.5 (22.1-38.9)	25.1 (20.4-29.8)	1398.8
	10.0	34.8 (21.7-47.8)	38.2 (32.3-44.0)	42.4 (34.9-49.8)	27.2 (20.5-33.8)	2013.5
CFX	2.0	0.4 (0.4-0.4)	0.9 (0.9-0.9)	5.6 (3.4-7.8)	2.5 (1.9-3.1)	176.8
	6.0	4.8 (2.3-7.3)	8.8 (3.8-13.8)	10.9 (3.4-18.4)	3.6 (1.8-5.5)	433.3
	10.0	9.5 (5.3-13.7)	13.1 (6.4-19.8)	18.8 (13.0-24.6)	8.1 (3.9-12.3)	755.8
CTX	0.2	0.3 (0.3-0.3)	0.8 (0.2-1.4)	2.3 (1.7-2.9)	1.1 (0.5-1.6)	79.8
	1.0	1.3 (0.2-2.4)	3.2 (1.3-5.0)	7.0 (4.2-9.7)	6.4 (4.7-8.1)	300.0
	2.0	5.3 (1.7-8.9)	9.0 (6.2-11.7)	21.2 (16.5-25.9)	15.0 (6.4-23.6)	841.0
AZT	0.2	0.5 (0.2-0.8)	1.3 (0.7-1.8)	1.7 (1.1-2.3)	1.1 (1.0-1.0)	72.0
	2.0	4.3 (2.6-5.9)	8.8 (4.6-13.0)	10.2 (6.9-13.5)	8.3 (3.4-20.2)	485.5
	10.0	9.2 (5.0-13.3)	21.8 (9.9-33.7)	31.2 (15.4-47.0)	26.1 (5.3-46.9)	1412.0
CMX	0.05	ND	ND	<1	ND	
	0.2	<1	2.6	2.8	2.3	135.0
	0.5	ND	ND	4.2	ND	
	2.0	6.5	16.8	22.7	17.2	1011.3

ND No determinado. AUC calculadas a partir de los datos del estudio número 9. Datos tomados del póster correspondiente a la cita bibliográfica 142 (Soriano, F.; Avilés, P. y Aguilar, L., 1991) y del trabajo correspondiente a la cita bibliográfica 72 (Soriano, F.; Ponte, C.; Santamaría, M. y Jiménez Arriero, M., 1990).

TABLA 23. UNIÓN A PROTEÍNAS Y VIDA MEDIA EN RATAS (*)

ANTIBIOTICO	UP (%)	t _{1/2} (min)
CMX	25	50
CFX	34	25
CTX	52	28

(*) Basada en las citas bibliográficas 162-167

TABLA 24. MORTALIDAD PARA CADA DOSIS EN EL MODELO ANIMAL, INDUCIDA POR E.COLI ATCC 25922

ANTIBIOTICO	DOSIS (mg)	MORTALIDAD (%)		Concentración media en el pico sérico (mg/l)	Cociente de la concentración en el pico sérico con respecto a:	
		24 h.	48 h.		CMI (*)	CMI (**)
CMX	0.05	100	-	<1	<1	<1
	0.2	2.5	12.5	2.8	2.8	1.4
	0.5	0	15	4.2	4.2	2.1
	2	0	0	22.7	22.7	11.3
CFX	6	5	5	10.9	5.4	5.4
CTX	0.2	30	75	2.3	19.1	2.4
	1	5	5	7.0	58.3	7.3
CFU	6	0	0	26.5	6.6	1.6
	AMP	6	35	65	14.8	3.7
PIP	15	0	0	47.6	11.9	5.9
	10	85	90	28.8	14.4	0.1
	50	65	85	49.0	24.5	0.2
	150	25	25	63.3	31.6	0.2
AZT	300	15	15	114.4	57.2	0.4
	0.2	15	35	1.7	14.1	0.01
	2	15	30	10.2	85	0.08
	10	15	15	31.2	260	0.26

(*) CMI determinada con inóculo de 5×10^5 ufc/ml

(**) CMI determinada con inóculo de 10^8 ufc/ml

Tomada del póster correspondiente a la cita bibliográfica 73 (Soriano, F.; Avilés, P. y Aguilar, L., 1991).

TABLA 25. RELACIÓN DE PARÁMETROS FARMACOLÓGICOS Y TSA PARA CONSECUCCIÓN DE MORTALIDADES $\leq 5\%$

ANTIBIOTICO	Parámetro farmacológico: Nivel pico	RELACION DEL PARAMETRO FARMACOLOGICO CON:					
		CMI	CMI _{IG}	CMI _{MC}	CMI _{MCIG}	CLM _{30%}	CLM _{75%}
CMX	2.8	2.8	1.4	1.4	1.4	5.6	2.8
CFX	10.9	5.4	5.4	1.4	1.4	5.4	2.7
CTX	7.0	233	3.5	58	3.5	7.0	3.5
	1% AUC						
CMX	1.4	1.4	0.7	0.7	0.7	2.7	2.7
CFX	4.3	2.2	2.2	0.5	0.5	2.2	1.1
CTX	3.0	100	1.5	25	1.5	3.0	1.5
	Increment. T (*)						
CMX	t _{1/2} = 50	1.6	0.6	0.6	0.6	2.6	2.6
CFX	t _{1/2} = 25	2.6	2.6	0.5	0.5	2.6	1.5
CTX	t _{1/2} = 28	8.0	1.9	6.0	1.9	2.9	1.9
	Increment. t (**)						
CMX		1.7	0.8	0.8	0.8	2.6	2.6
CFX		1.5	1.5	0.5	0.5	1.5	1.1
CTX		4.2	1.2	3.3	1.2	1.8	1.2

(*) Tiempo medido en unidades t_{1/2}, que la concentración sérica se encuentra sobre el valor del TSA, a partir del pico sérico.

(**) Tiempo medido en horas que la concentración sérica se encuentra sobre el valor del TSA en el intervalo entre las dos dosis.

TABLA 26. RECORRIDOS (VALOR MÁXIMO-VALOR MÍNIMO)
PARA CADA RELACIÓN FARMACODINAMICA

PARAMETRO FARMACOLOGICO	CMI	CMI _{IG}	CMI _{MC}	CMI _{MCIG}	CLM _{30%}	CLM _{75%}
NIVEL	205	2.1	56.6	2.1	1.4	0.8
1% AUC	98.6	1.5	24.5	1.0	0.8	1.6
T	6.4	2.0	5.5	1.4	0.3	1.1
t	2.7	0.7	2.8	0.7	1.1	1.5

TABLA 27. RELACIÓN DISMINUCIÓN DE LA MORTALIDAD Y PICO SÉRICO/TSA

ANTIBIOTICO	NIVEL PICO	Dism. Mortalidad 24 h (%)	NIVEL PICO SOBRE:					
			CMI	CMI _{IG}	CMI _{MC}	CMI _{MCIG}	CLM _{30%}	CLM _{75%}
CMX	2.8	97.5	2.8	1.4	1.4	1.4	5.6	5.6
	4.2	100.0	4.2	2.1	2.1	2.1	8.4	8.4
CFX	5.6	75.0	2.8	2.8	0.7	0.7	2.8	1.4
	10.9	95.0	5.5	5.5	1.4	1.4	5.5	2.7
	18.8	100.0	9.4	9.4	2.5	2.5	9.4	4.7
CTX	2.3	70.0	76.7	1.2	19.2	1.2	2.3	1.2
	7.0	95.0	233.3	3.5	58.3	3.5	7.0	3.5
	21.2	100.0	706.7	10.6	176.7	10.6	21.2	10.6

TABLA 28. RELACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE LA MORTALIDAD CON 1% AUC/TSA

ANTIBIO.	AUC	DISM. MORT. 24h.(%)	1% AUC SOBRE:					
			CMI	CMI _{IG}	CMI _{MC}	CMI _{MCIG}	CLM _{30%}	CLM _{75%}
CMX	135	97.5	1.3	0.7	0.7	0.7	2.7	2.7
	1011	100.0	10.1	5.1	5.1	5.1	20.2	20.2
CFX	177	75.0	0.9	0.9	0.2	0.2	0.9	0.4
	433	95.0	2.2	2.2	0.5	0.5	2.2	1.1
	756	100.0	3.8	3.8	0.9	0.9	3.8	1.9
CTX	80	70.0	26.7	0.4	6.7	0.4	0.8	0.4
	300	95.0	100.0	1.5	25.0	1.5	3.0	1.5
	841	100.0	280.3	4.2	70.1	4.2	8.4	4.2

TABLA 29. RELACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE LA MORTALIDAD CON T/TSA

ANTIBIOT.	DISMIN. MORTAL. 24h.(%)	TIEMPO DE ANTIBIOTICO (EXPRESADO EN VIDAS MEDIAS Y A PARTIR DEL NIVEL EN EL PICO) SOBRE:					
		CMI	CMI _{IG}	CMI _{MC}	CMI _{MCIG}	CLM _{30%}	CLM _{75%}
CMX	97.5	1.6	0.6	0.6	0.6	2.6	2.6
	100.0	2.1	1.1	1.1	1.1	3.0	3.0
CFX	75.0	1.6	1.6	0.0	0.0	1.6	0.6
	95.0	2.6	2.6	0.5	0.5	2.6	1.5
CTX	100.0	3.3	3.3	1.3	1.3	4.0	3.3
	70.0	6	0.3	4.3	0.3	1.2	0.3
	95.0	8	1.9	6.0	1.9	2.9	1.9
	100.0	9.5	3.4	7.5	3.4	4.5	3.4

TABLA 30. RELACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE LA MORTALIDAD CON t/TSA

ANTIBIOT.	DISMIN. MORTAL. 24h.(%)	TIEMPO DE ANTIBIOTICO (EXPRESADO EN HORAS Y A PARTIR DE LA DOSIS) SOBRE:					
		CMI	CMI _{IG}	CMI _{MC}	CMI _{MCIG}	CLM _{30%}	CLM _{75%}
CMX	97.5	1.7	0.8	0.8	0.8	2.6	2.6
CFX	75.0	0.8	0.8	0.0	0.0	0.8	0.3
	95.0	1.5	1.5	0.5	0.5	1.5	1.1
	100.0	1.9	1.9	1.0	1.0	2.1	1.9
CTX	70.0	3.3	0.1	2.5	0.1	0.9	0.1
	95.0	4.2	1.2	3.3	1.2	1.8	1.2
	100.0	4.9	2.1	4.0	2.1	2.6	2.1

TABLA 31. PROPIEDADES FARMACOCINETICAS DE CMX

	DOSIS DE CMX	
	1 g	2 g
Cmax (mg/L)	56.6 ± 16.1	117.3 ± 7.6
t _{1/2} (h)	2.1 ± 0.14	1.9 ± 0.06
V (L/1.73 m ²)	21.4 ± 2.1	21.6 ± 1.2
V _{ss} (L/1.73 m ²)	23.4 ± 1.7	25.2 ± 1.2
MRT (h)	3.3 ± 0.1	3.3 ± 0.1
CL (L/h por 1.73 m ²)	7.2 ± 0.3	7.8 ± 0.3
AUC (mcg.h/ml por 1.73 m ²)	140.9 ± 5.8	260.0 ± 10.4
V mod (L/1.73 m ²)	21.6 ± 2.2	21.5 ± 1.2
MRT mod (h)	3.0 ± 0.2	2.8 ± 0.1
AUC mod (mcg.h/ml por 1.73 m ²)	139.4 ± 5.9	261.6 ± 11.1

Datos expresados en Media ± SD

Tomada del trabajo correspondiente a la cita bibliográfica 145 (Aguilar, L.; Esteban, C.; Frías, J.; Balcabao, I. P.; Carcas, A. and Dal-Ré, R., 1993) y del póster correspondiente a la cita 144 (Esteban, C.; Ibáñez, C.; Macia, M. A. y Aguilar, L., 1990).

TABLA 32 A. PODERES BACTERICIDAS SERICOS: MEDIANA (RANGO)
(N = 6 VOLUNTARIOS). DOSIS DE 1 g.

TIEMPO (h)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
0.5	1024 (512-2048)	512 (256-1024)	512 (512-1024)	1024 (512-1024)
2	128 (16-512)	32 (32-256)	32 (32-512)	64 (64-512)
4	4 (2-32)	8 (2-32)	8 (2-64)	8 (4-32)
6	2 (<2-8)	2 (<2-4)	4 (<2-8)	2 (<2-8)
8	0 (<2-2)	0 (<2-<2)	0 (<2-2)	0 (<2-4)
12	0 (<2-2)	0 (>2-<2)	0 (<2-2)	0 (<2-<2)
16	0 (<2-<2)	0 (<2-<2)	0 (<2-<2)	0 (<2-<2)
24	0 (<2-<2)	0 (<2-<2)	0 (<2-<2)	0 (<2-<2)

Tomada del trabajo correspondiente a la cita bibliográfica 145 (Aguilar, L.; Esteban, C.; Frías, J.; Balcabao, I. P.; Carcas, A. and Dal-Ré, R., 1993).

TABLA 32 B. PODERES BACTERICIDAS SÉRICOS: MEDIANA (RANGO)
(N = 6 VOLUNTARIOS). DOSIS DE 2 g.

TIEMPO (h)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
0.5	> 2048 (1024-> 2048)	> 2048 (1024-> 2048)	> 2048 (1024-> 2048)	> 2048 (1024-> 2048)
2	1024 (512-1024)	1024 (512-1024)	1024 (512-1024)	1024 (1024-2048)
4	256 (128-512)	256 (128-512)	256 (128-1024)	256 (128-1024)
6	64 (16-256)	32 (32-128)	128 (32-256)	32 (16-512)
8	16 (8-32)	16 (8-32)	16 (8-128)	8 (8-64)
12	2 (2-8)	2 (<2-8)	4 (2-16)	2 (<2-8)
16	0 (<2-2)	0 (<2-2)	2 (<2-4)	0 (<2-2)
24	0 (<2-<2)	0 (<2-<2)	0 (<2-<2)	0 (<2-<2)

Tomada del trabajo correspondiente a la cita bibliográfica 145 (Aguilar, L.; Esteban, C.; Frías, J.; Balcabao, I. P.; Carcas, A. and Dal-Ré, R., 1993).

TABLA 33. AUBCS: MEDIANA (RANGO)
(N = 6 VOLUNTARIOS)

CEPA ATCC	AUBC (1 g)	AUBC (2 g)	AUBC 2 g/AUBC 1 g
E.coli 25922	952 (616-2056)	4318 (1958-4988)	4.5
K.pneumoniae 13883	670 (268-1288)	3681 (2572-4536)	5.4
S.marcescens 8100	745 (444-1822)	4028 (3276-6360)	5.4
B.fragilis 25285	954 (504-1736)	4300 (3628-7916)	4.5

Tomada del trabajo correspondiente a la cita bibliográfica 145 (Aguilar, L.; Esteban, C.; Frías, J.; Balcabao, I. P.; Carcas, A. and Dal-Ré, R., 1993).

TABLA 34 A. RELACIÓN ENTRE PBS, NIVELES SERICOS Y ACTIVIDAD "IN VITRO"
E. COLI

	CMI	CMB _{6H}	CMB _{24H}
Concordancias positivas (*)	56.0 % n=47	46.4 % n=39	56.0 % n=47
Concordancias negativas (**)	16.6 % (***) n=14	40.5 % (***) n=34	22.6 % n=19
Concordancias totales	72.6 % (****) n=61	86.9 % (****) n=73	78.6 % n=66
Discordancias	27.4 % n=23	13.1 % n=11	21.4 % n=18
Total	100 % n=84	100 % n=84	100 % n=84

(*) Nivel > concentración "in vitro" y PBS ≥ 8 en el mismo punto de extracción

(**) Nivel < concentración "in vitro" y PBS < 8 en el mismo punto de extracción

(***) CMI vs CMB_{6h}, p<0.01

(****) CMI vs CMB_{6h}, p<0.05

TABLA 34 B. RELACIÓN ENTRE PBS, NIVELES SERICOS Y ACTIVIDAD "IN VITRO"
KLEBSIELLA PNEUMONIAE

	CMI	CMB _{6H}	CMB _{24H}
Concordancias positivas (*)	58.3 % n=49	58.3 % n=49	58.3 % n=49
Concordancias negativas (**)	7.1 % n=6	16.7 % n=14	16.7 % n=14
Concordancias totales	65.4 % n=55	75.0 % n=63	75.0 % n=63
Discordancias	34.6 % n=29	25.0 % n=21	25.0 % n=21
Total	100 % n=84	100 % n=84	100 % n=84

(*) Nivel > concentración "in vitro" y PBS ≥ 8 en el mismo punto de extracción

(**) Nivel < concentración "in vitro" y PBS < 8 en el mismo punto de extracción

TABLA 34 C. RELACIÓN ENTRE PBS, NIVELES SERICOS Y ACTIVIDAD "IN VITRO"
SERRATIA MARCESCENS

	CMI	CMB _{6H}	CMB _{24H}
Concordancias positivas (*)	47.6 % n=40	58.3 % (***) n=49	34.5 % (***) n=29
Concordancias negativas (**)	39.3 % n=33	33.3 % n=28	41.7 % n=35
Concordancias totales	86.9 % n=73	91.6 % (***) n=77	76.2 % (***) n=64
Discordancias	13.1 % n=11	8.4 % n=7	23.8 % n=20
Total	100 % n=84	100 % n=84	100 % n=84

(*) Nivel > concentración "in vitro" y PBS ≥ 8 en el mismo punto de extracción

(**) Nivel < concentración "in vitro" y PBS < 8 en el mismo punto de extracción

(***) CMB_{6h} vs CMB_{24h}, p < 0.05

TABLA 34 D. RELACIÓN ENTRE PBS, NIVELES SERICOS Y ACTIVIDAD "IN VITRO"
BACTEROIDES FRAGILIS

	CMI	CMB _{6H}	CMB _{24H}
Concordancias positivas (*)	53.6 % n=45	52.4 % n=44	53.6 % n=45
Concordancias negativas (**)	8.3 % (***) n=7	34.5 % (***) n=29	8.3 % (***) n=7
Concordancias totales	61.9 % (***) n=52	86.9 % (***) n=73	61.9 % (***) n=52
Díscordancias	38.1 % n=32	13.1 % n=11	38.1 % n=32
Total	100 % n=84	100 % n=84	100 % n=84

(*) Nivel > concentración "in vitro" y PBS ≥ 8 en el mismo punto de extracción

(**) Nivel < concentración "in vitro" y PBS < 8 en el mismo punto de extracción

(***) CMI vs CMB_{6h} y CMB_{6h} vs CMB_{24h}, p < 0.001

TABLA 34 E. RELACIÓN ENTRE PBS, NIVELES SERICOS Y ACTIVIDAD "IN VITRO"

	CMI	CMB _{6h}	CMB _{24h}
Concordancias positivas (*)	53.9 % n=181	53.8 % n=181	50.6 % n=170
Concordancias negativas (**)	17.9 % n=60	31.2 % n=105	22.3 % n=75
Concordancias totales	71.8 % (***) n=241	85.0 % (***) n=286	72.9 % (***) n=245
Discordancias	28.2 % n=95	15.0 % n=50	27.1 % n=91
Total	100 % n=336	100 % n=336	100 % n=336

(*) Nivel > concentración "in vitro" y PBS \geq 8 en el mismo punto de extracción

(**) Nivel < concentración "in vitro" y PBS < 8 en el mismo punto de extracción

(***) CMI vs CMB_{6h} y CMB_{6h} vs CMB_{24h}, p<0.001

Las Tablas 34 (A, B, C, D y E) han sido construidas a partir de los datos de los estudios números 14 y 15

TABLA 35. ADHESIÓN

	A = 1 g	B = 2 g
Fibra Nylon	93%	103%
Superficie Plastica	93%	83%

Tomada de la presentación oral correspondiente a la cita bibliográfica 10 (Corrales, I.; Aguilar, L.; Mato, R.; Frías, J.; Esteban, C. and Prieto, J., 1991)

TABLA 36. EFECTOS SOBRE LA FUNCIÓN FAGOCÍTICA
COMPARACIÓN DE MUESTRAS INDEPENDIENTES

INDICE	Control n=12	1 g n=5	2 g n=6
A (PMN-CAND)	50.5 ± 9.7	40.4 ± 9.8	41.8 ± 7.8
B (CAND ASOC PMN)	88.9 ± 32.3	68.5 ± 15.1	78.9 ± 15.0
C (CAND AD PMN)	40.3 ± 19.9	37.1 ± 4.4	59.1 ± 6.6 (*)
D (ING TOT)	45.5 ± 13.9	31.4 ± 12.5	19.8 ± 8.7 (**)
E (ING MUERT)	17.4 ± 2.9	2.5 ± 2.0 ***	3.6 ± 2.4 (***)
F (P. CANDID)	40.2 ± 8.8	10.4 ± 9.4 ***	18.1 ± 8.3 (***)

(*) p<0.05 vs 1 g

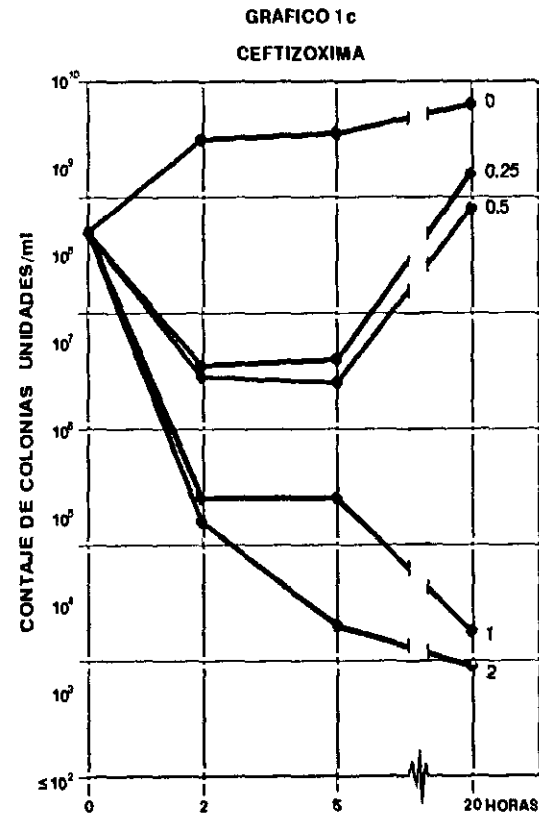
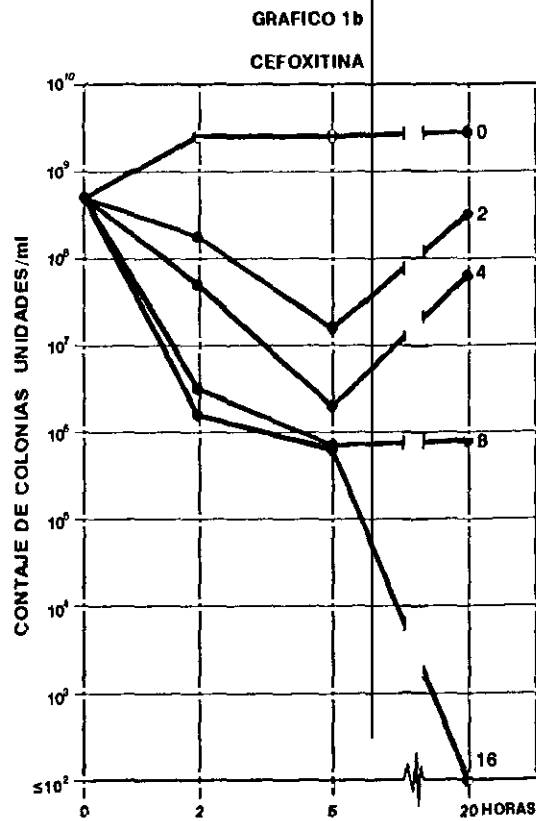
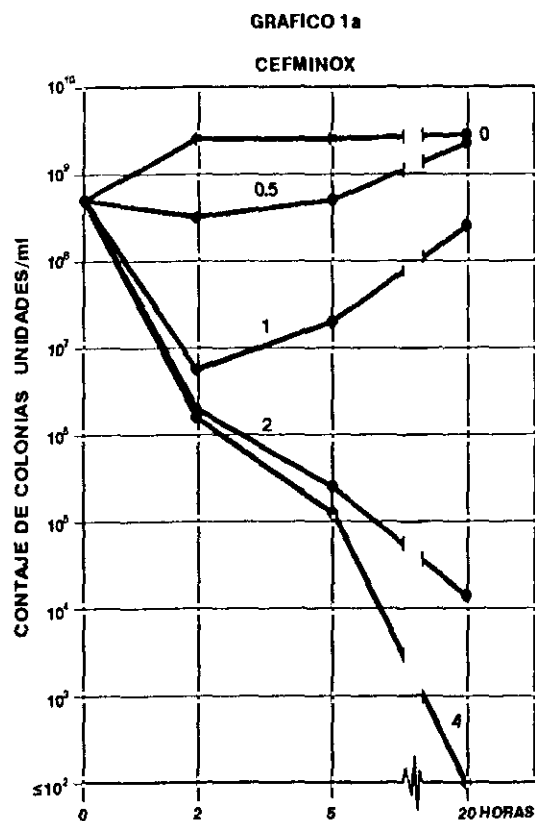
(**) p<0.05 vs control

(***) p<0.001 vs control

Tomada de la presentación oral correspondiente a la cita bibliográfica 10 (Corrales, I.; Aguilar, L.; Mato, R.; Frías, J.; Esteban, C. and Prieto, J., 1991) y al trabajo correspondiente a la cita bibliográfica 10b (Corrales, I.; Aguilar, L.; Mato, R.; Frías, J. and Prieto, J., 1993)

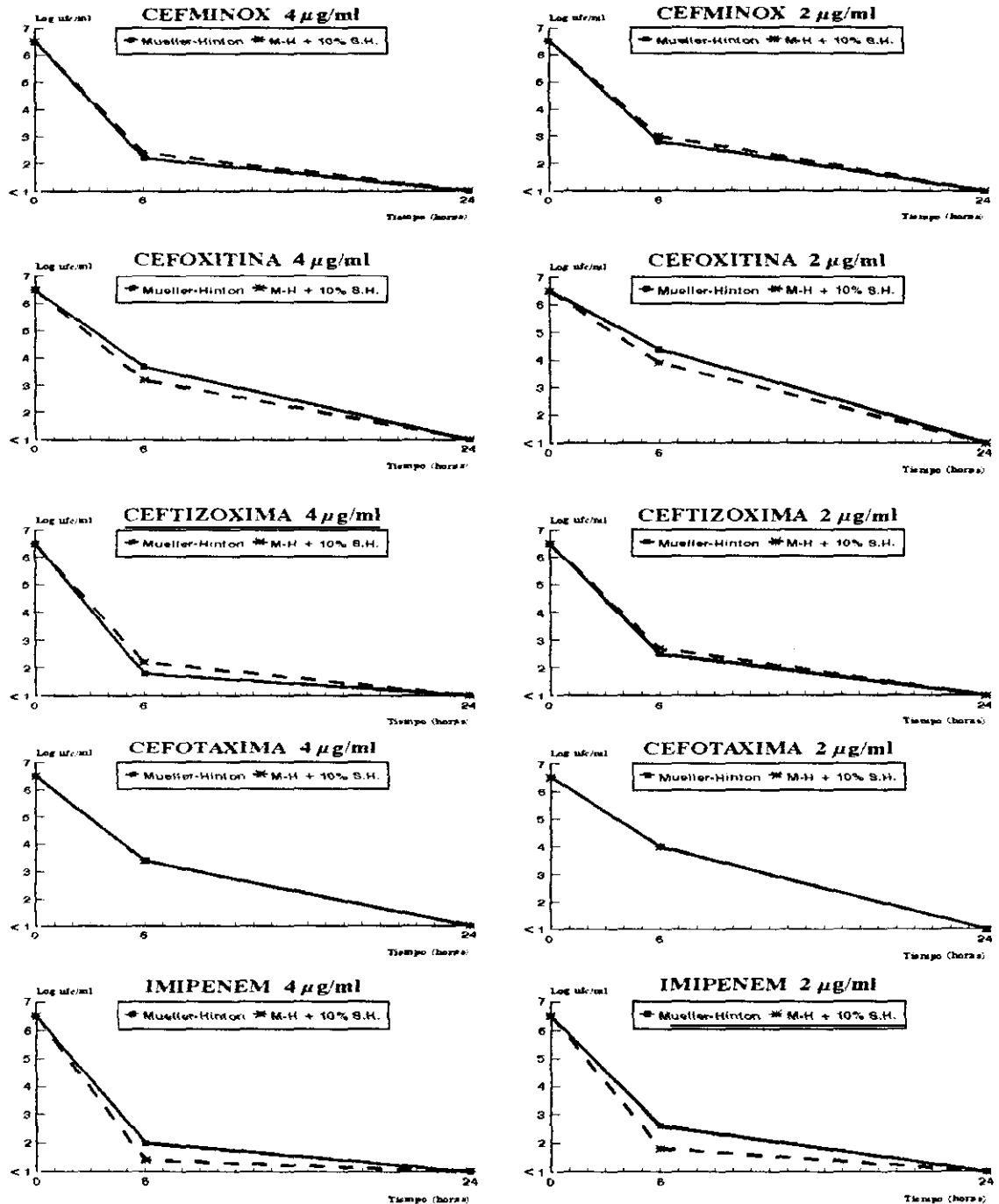
IX. GRAFICOS

GRAFICO 1. ACTIVIDAD BACTERICIDA EN MEDIO COMPLETO PARTIENDO DE INOCULO ALTO DE E. COLI ATCC 25922



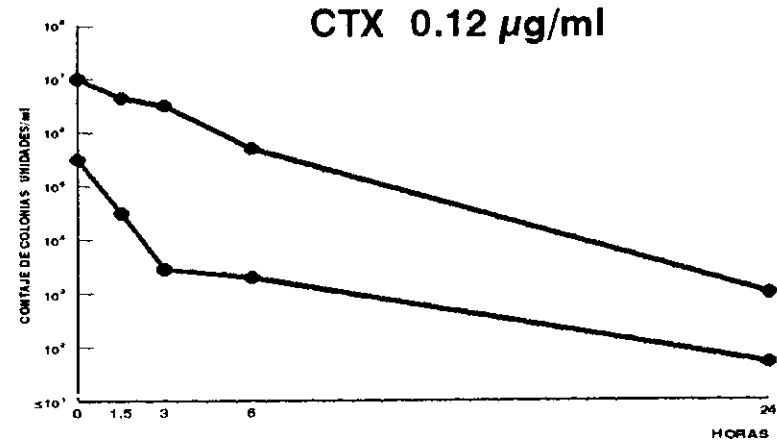
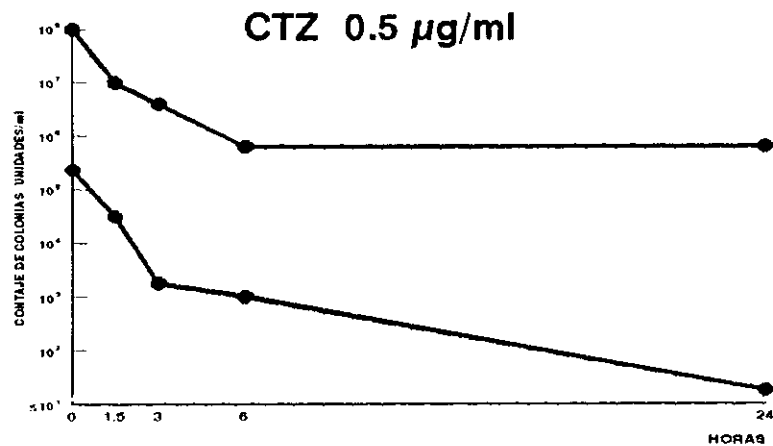
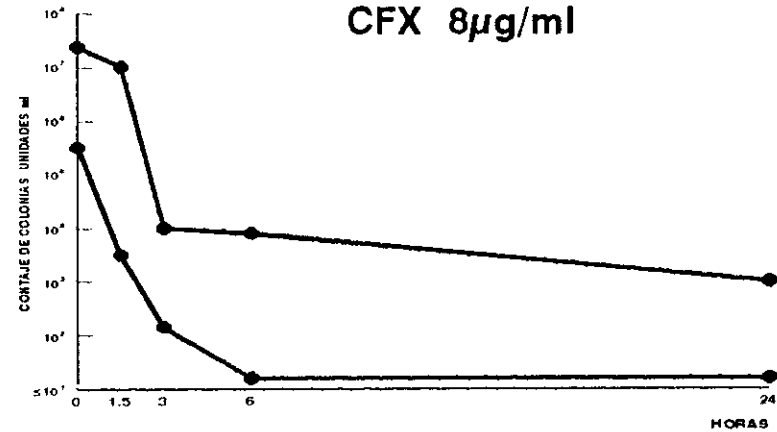
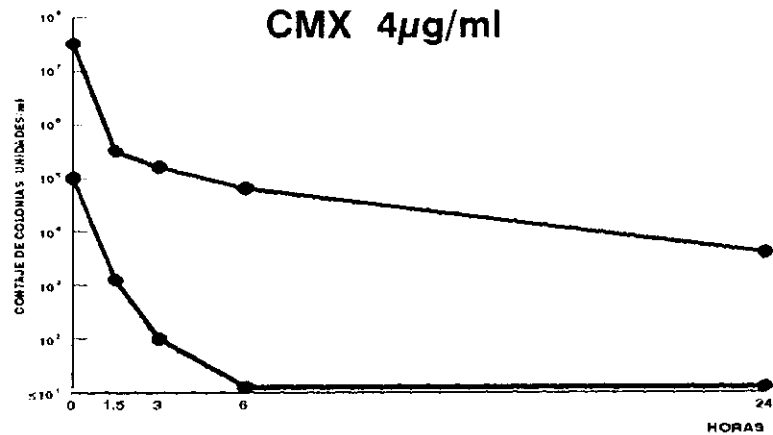
Tomado del informe final del Estudio número 4.

GRAFICO 2. CURVAS DE MUERTE BACTERIANA DE E. COLI ATCC 25922 EN MUELLER-HINTON CON Y SIN SUERO HUMANO (INOCULO INICIAL: $5 \cdot 10^6$ ufc/ml)



Curvas construídas a partir de los datos presentados en el poster correspondiente a la cita 142 (Soriano, F.; Avilés, P. and Aguilar, L., 1991).

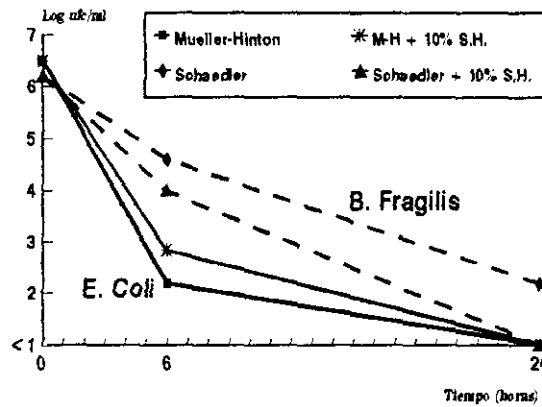
GRAFICO 3. CURVAS DE MUERTE BACTERIANA EN MUELLER-HINTON DE E. COLI ATCC 25922 A PARTIR DE INOCULO DE $5 \cdot 10^7$ ufc/ml Y 10^5 ufc/ml



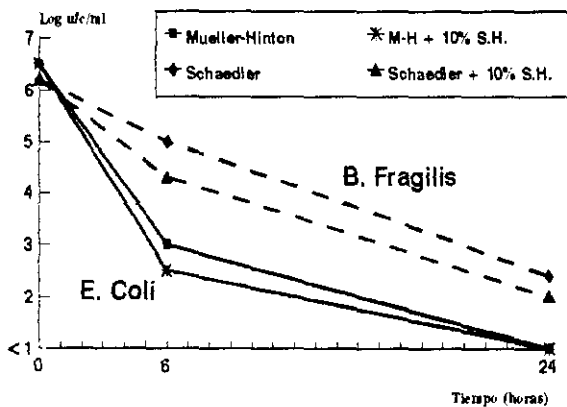
Tomado del poster correspondiente a la cita 142 b (Soriano, F. and Avilés, P., 1993).

GRAFICO 4. CURVAS DE MUERTE BACTERIANA (E. COLI ATCC 25922 Y B. FRAGILIS ATCC 25285) CON Y SIN SUERO HUMANO

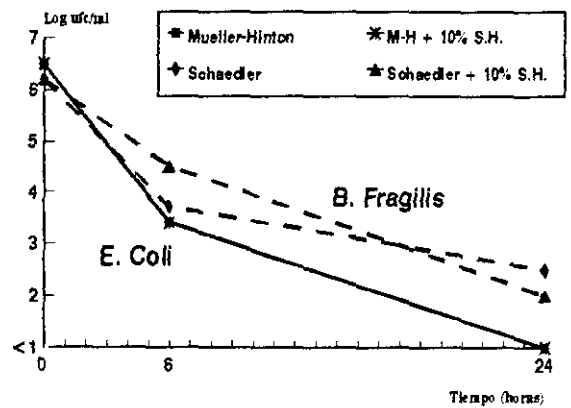
CEFMINOX 8 µg/ml



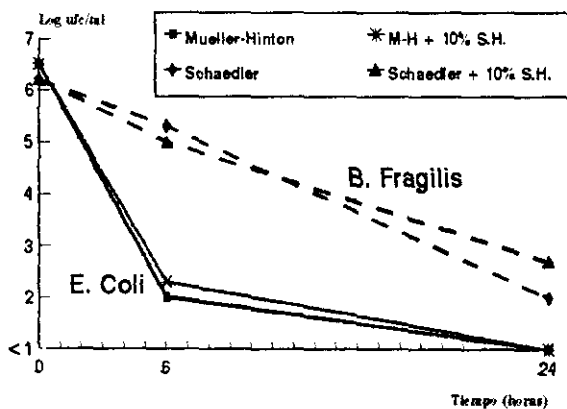
CEFOXITINA 8 µg/ml



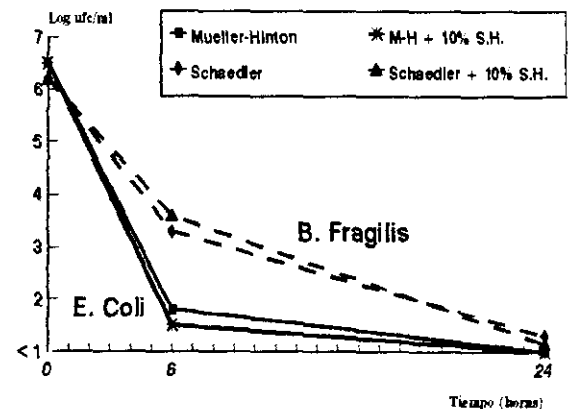
CEFOTAXIMA 8 µg/ml



CEFTIZOXIMA 8 µg/ml



IMIPENEM 8 µg/ml



Tomado del poster correspondiente a la cita 142
(Soriano, F.; Avilés, P. y Aguilar, L., 1991).

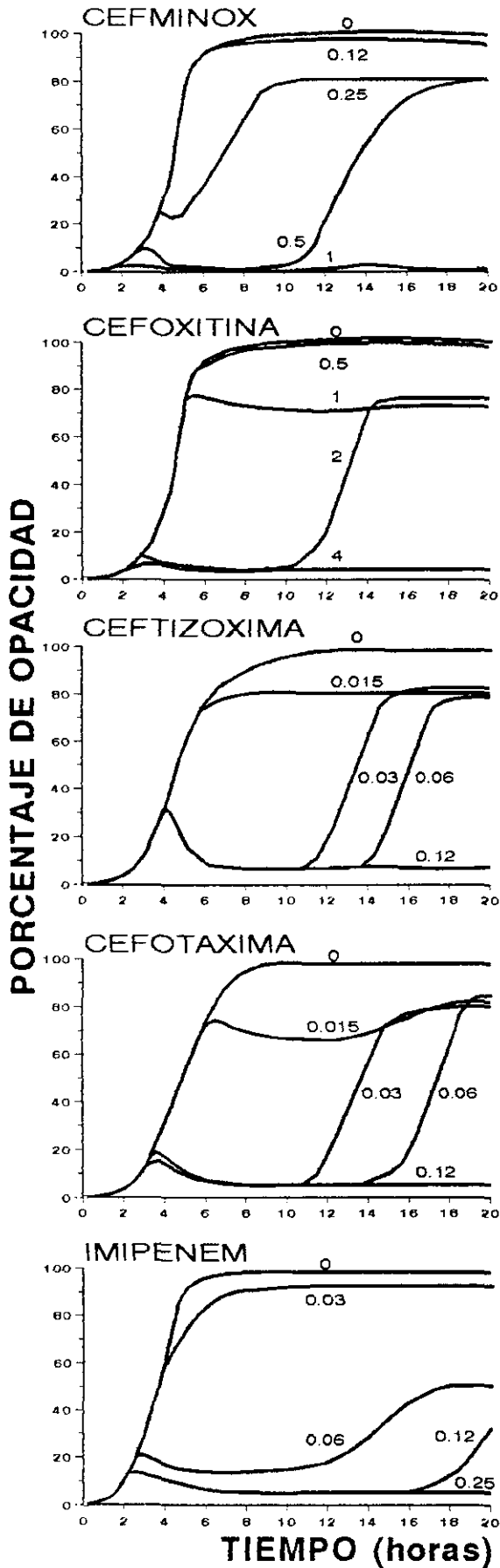
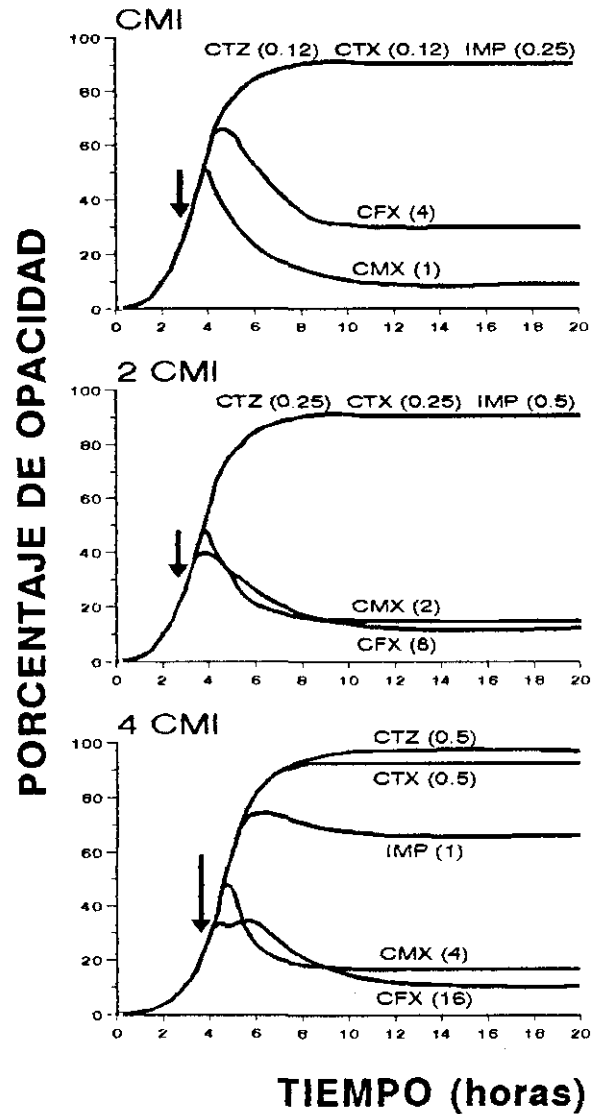
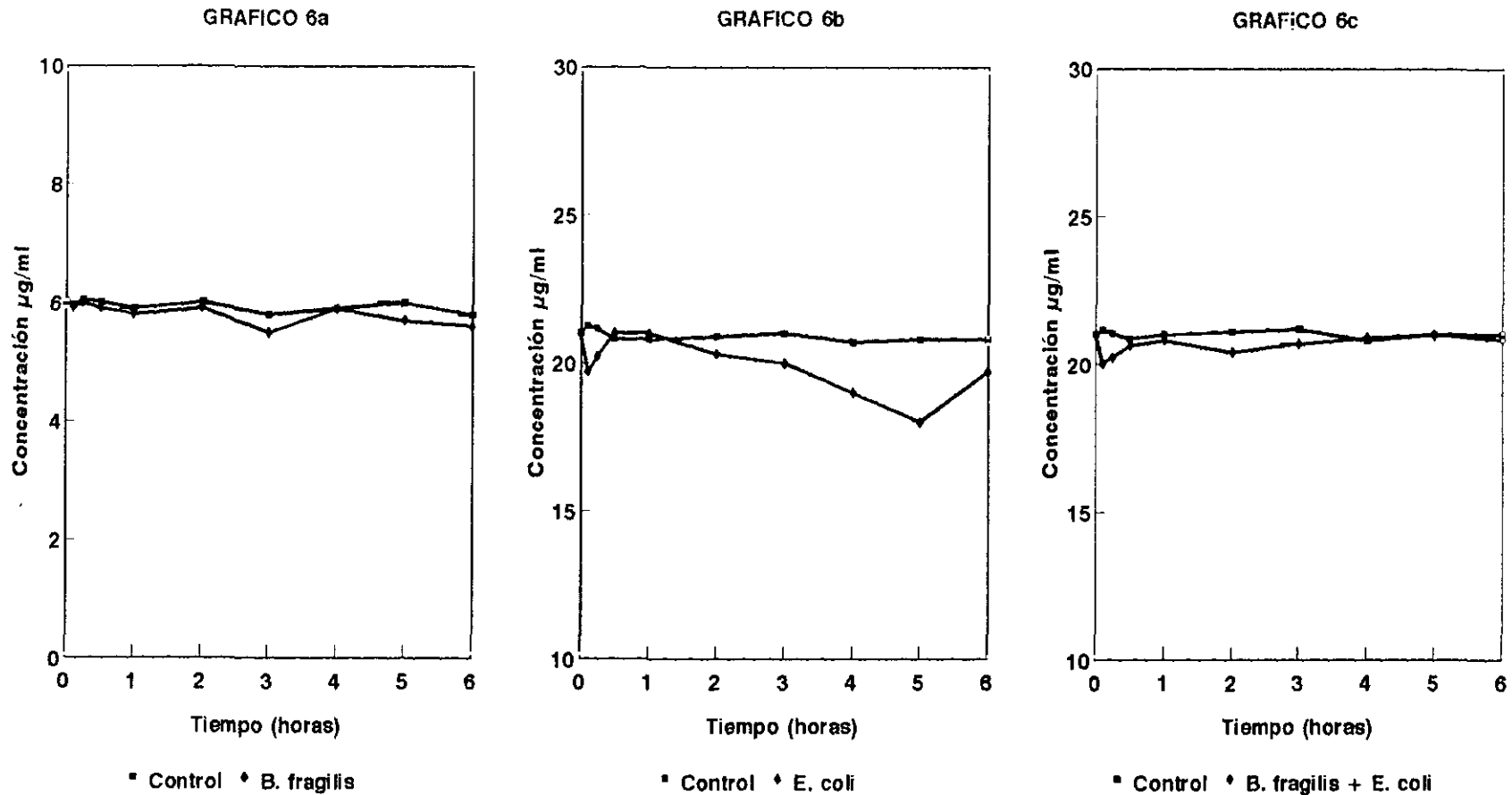


GRAFICO 5. CURVAS TURBIDIMETRICAS



Tomado de la publicación correspondiente a la cita 138 (Soriano, F.; Edwards, R. and Greenwood, D., 1992) y el poster correspondiente a la cita 139 (Soriano, F.; Edwards, R. and Greenwood, D., 1991).

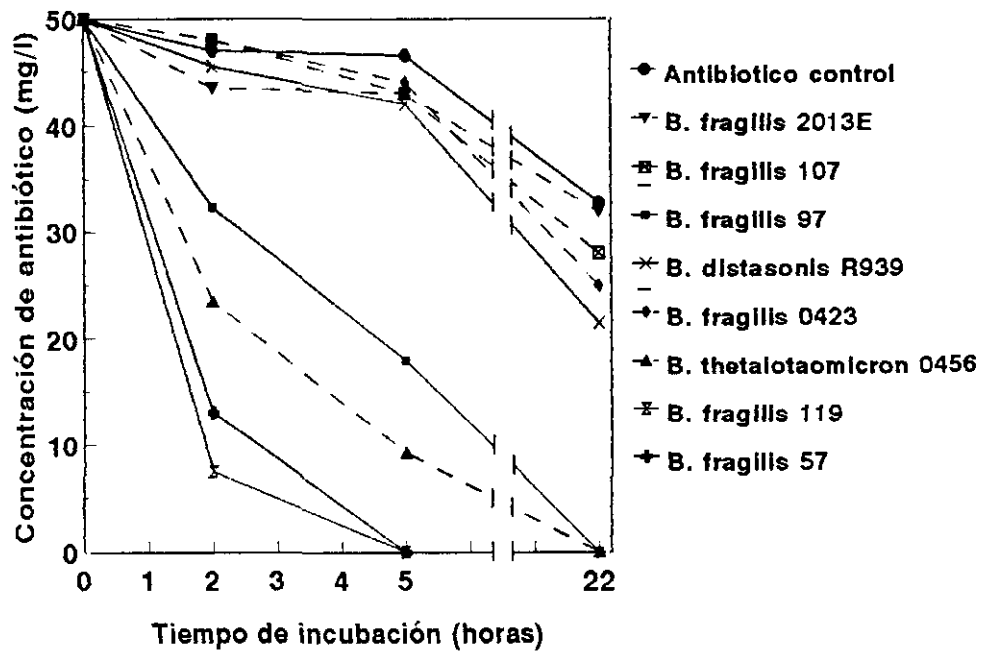
GRAFICO 6. CONSUMO DE CEFMINOX



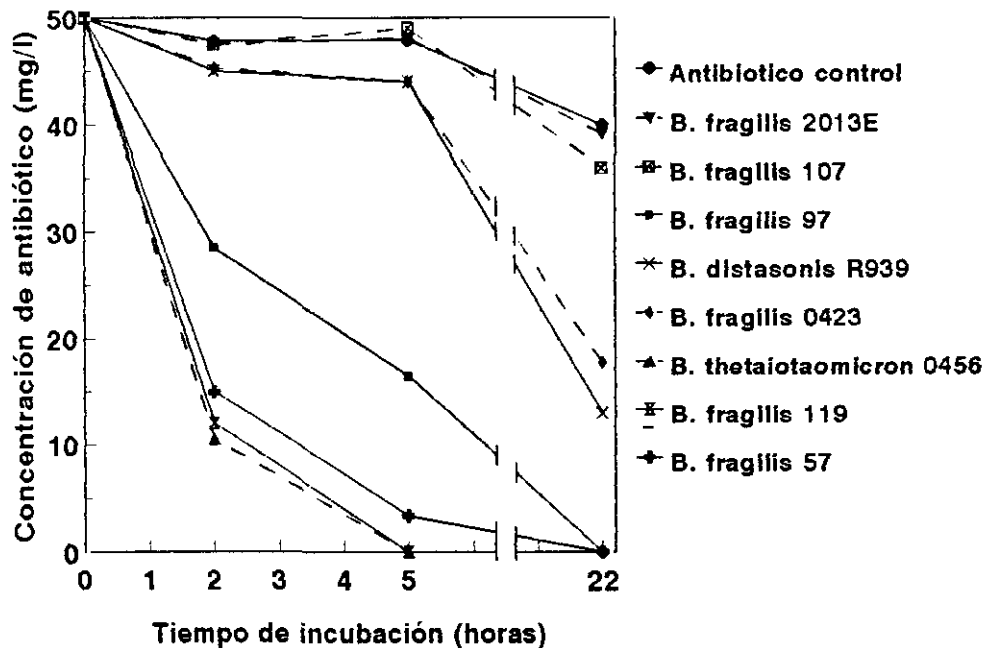
Tomado de la publicación correspondiente a la cita 143 (Martin, M.M.; Fuentes, F.; Izquierdo, J.; Minguez, F. y Gómez-Lus, M.L., 1992).

GRAFICO 7.

a) DEGRADACION ENZIMATICA DE CFX



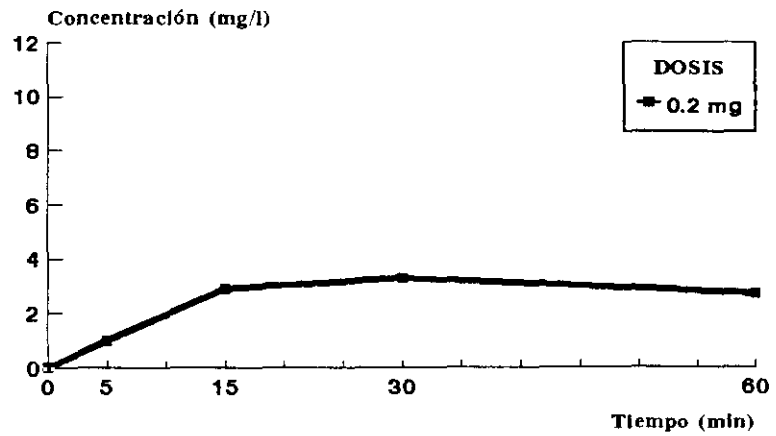
b) DEGRADACION ENZIMATICA DE CMX



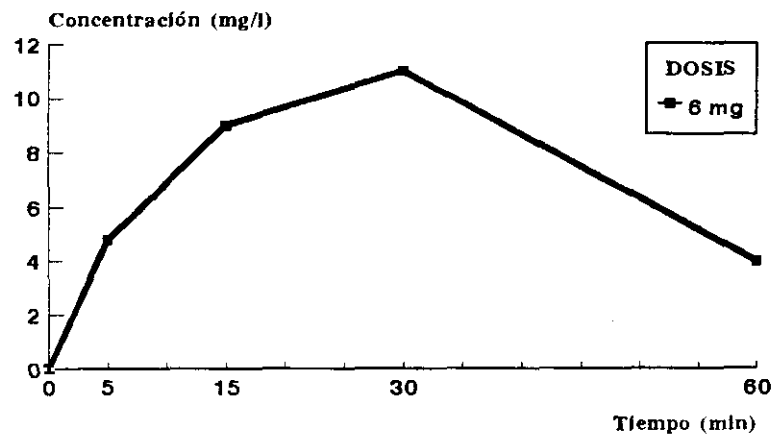
Tomado de la publicación correspondiente a la cita 140 (Soriano, F.; Edwards, R. and Greenwood, D., 1991).

GRAFICO 8. NIVELES DE CMX, CFX Y CTX EN RATA

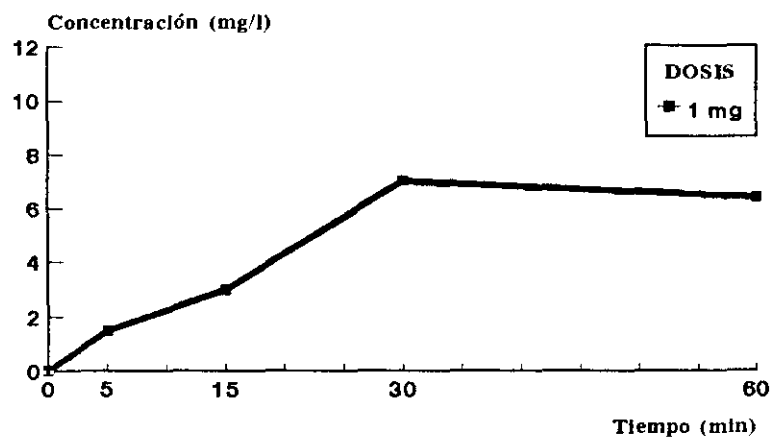
CEFMINOX



CEFOXITINA



CEFOTAXIMA



Tomado del poster correspondiente a la cita 73 (Soriano, F.; Avilés, P.; and Aguilar, L., 1991).

GRAFICO 9.. NIVEL/TSA

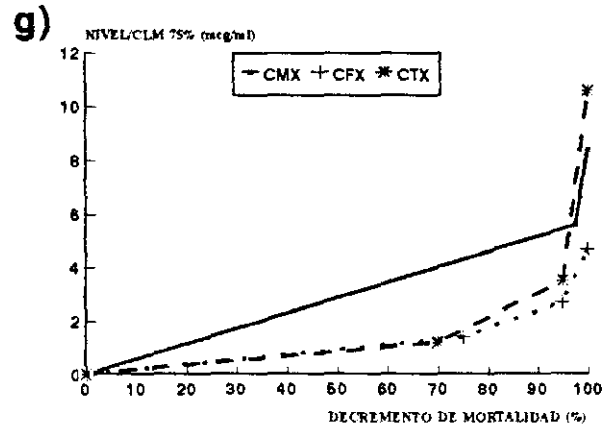
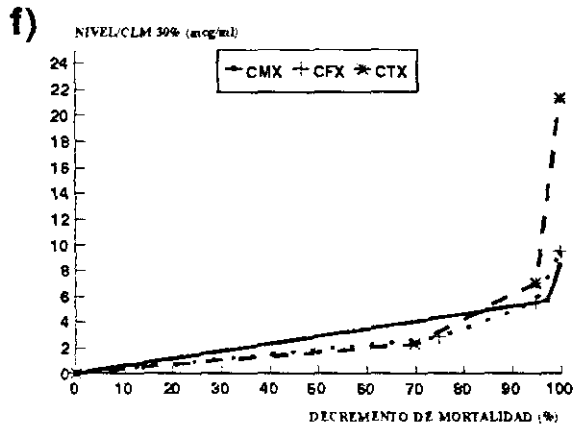
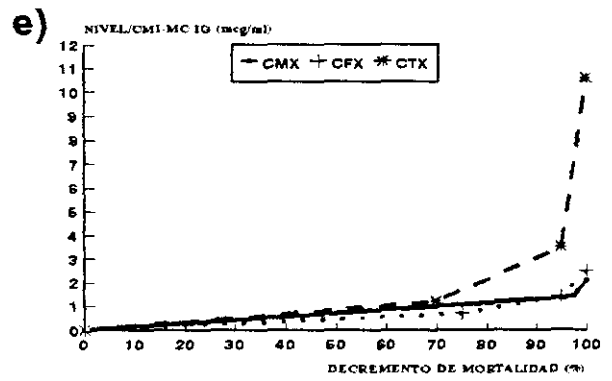
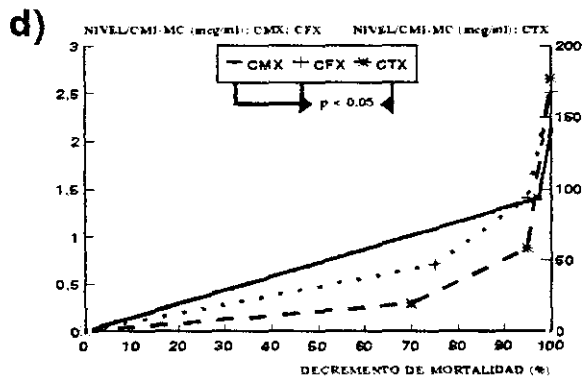
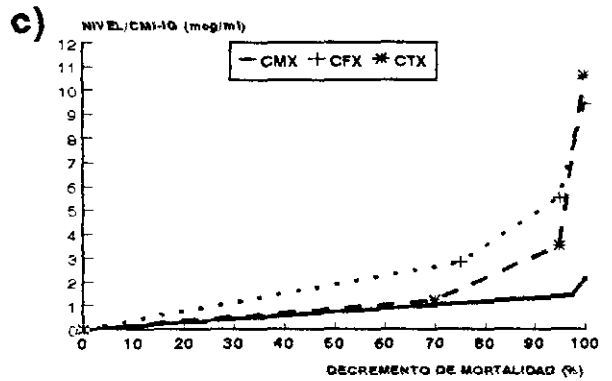
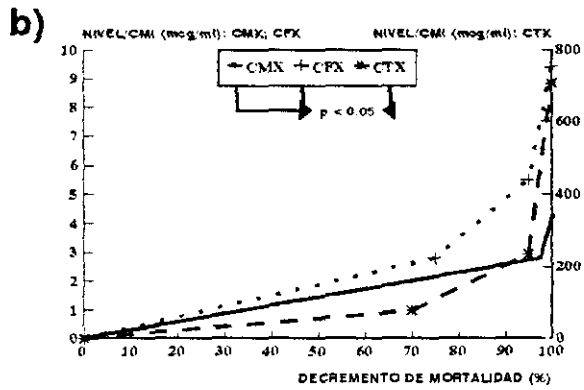
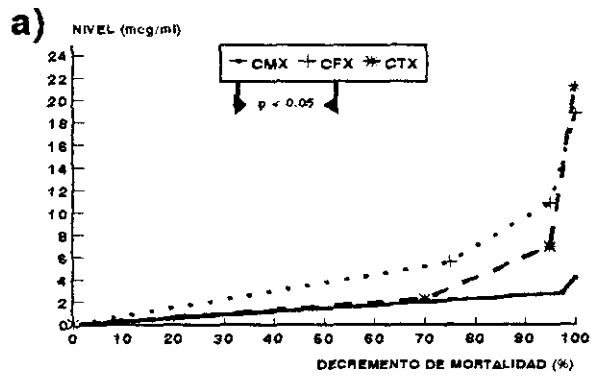


GRAFICO 10 ^{1/2} AUC/TSA

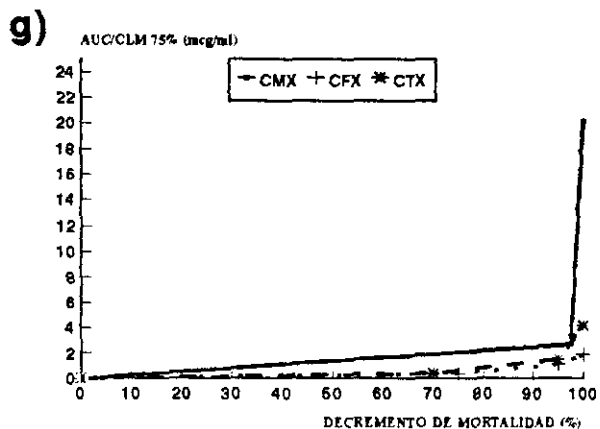
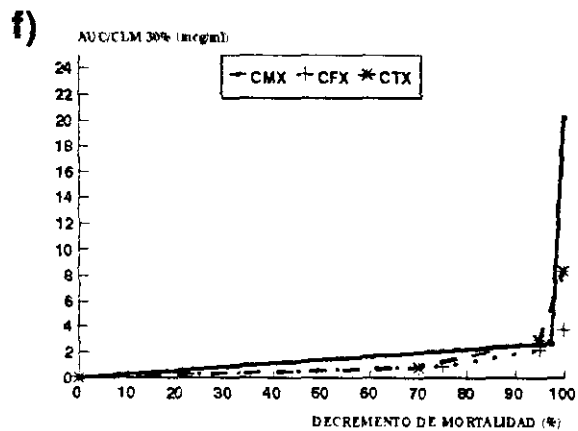
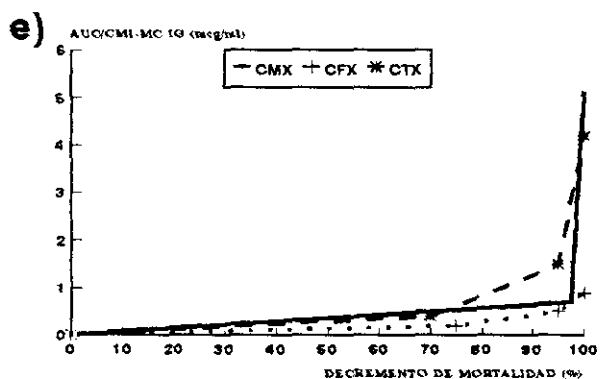
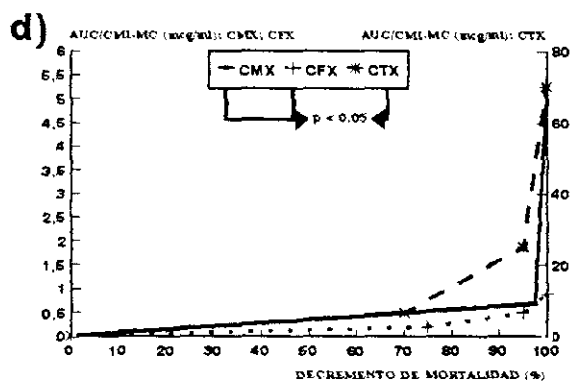
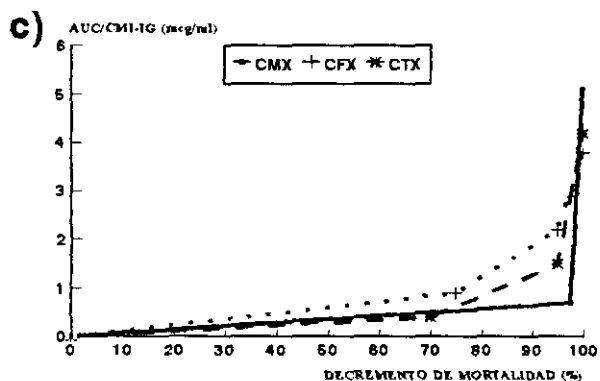
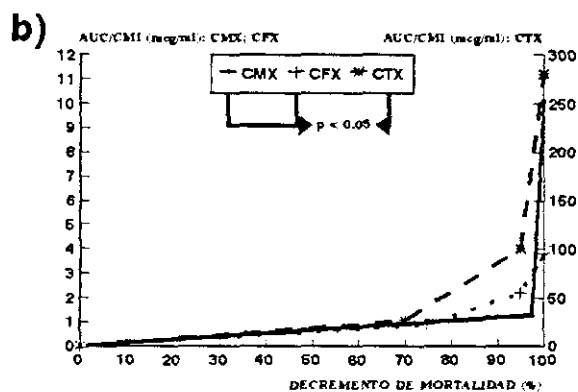
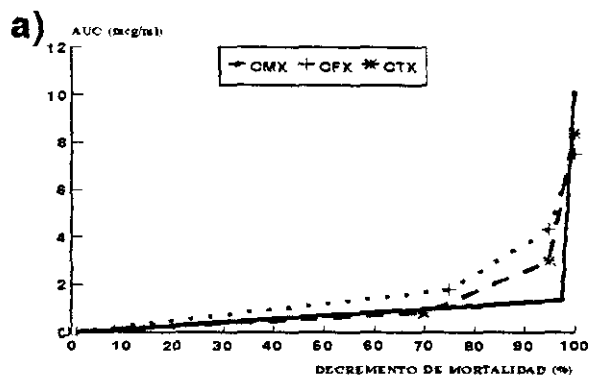


GRAFICO 11. T/TSA

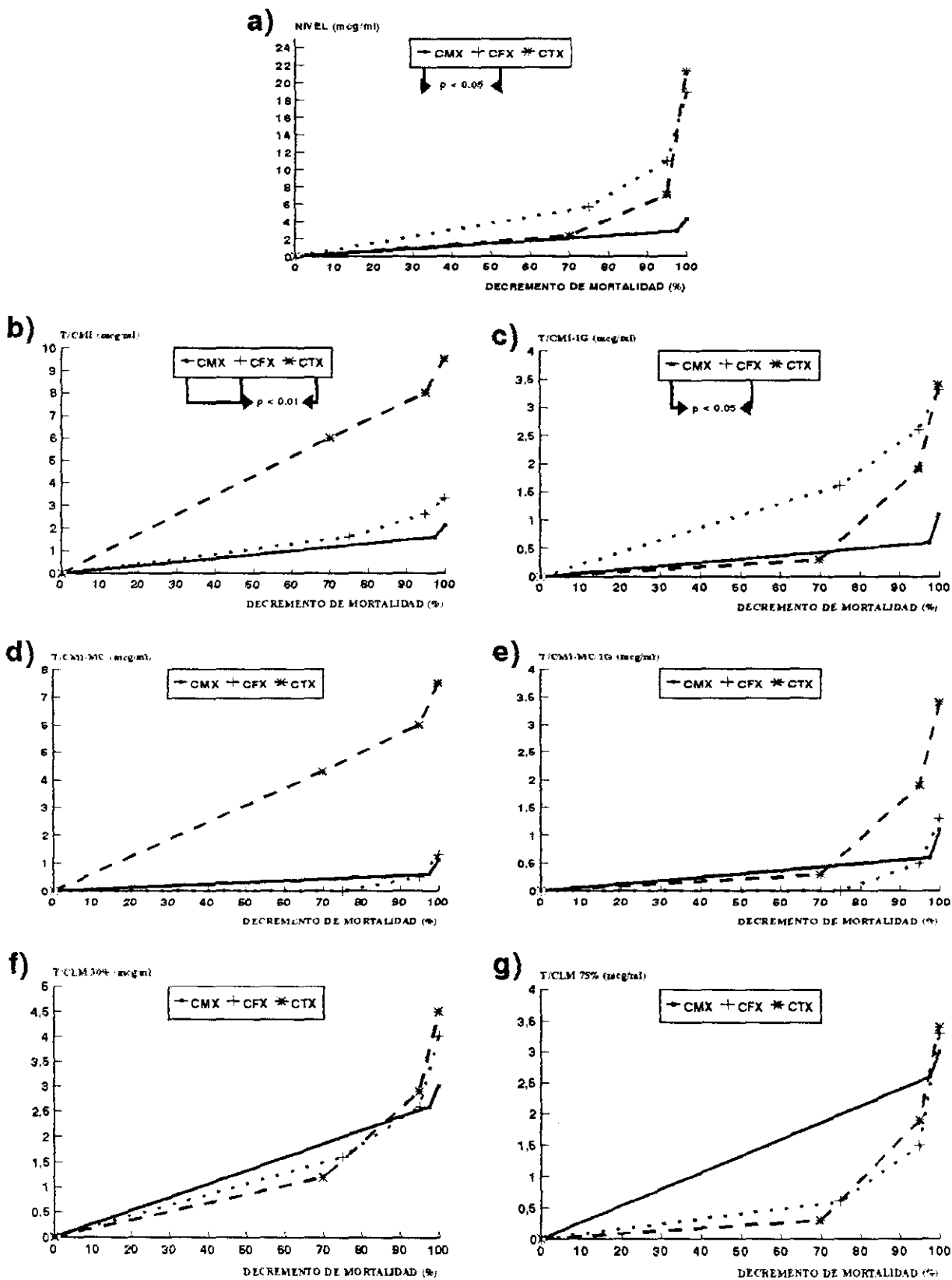


GRAFICO 12. t/TSA

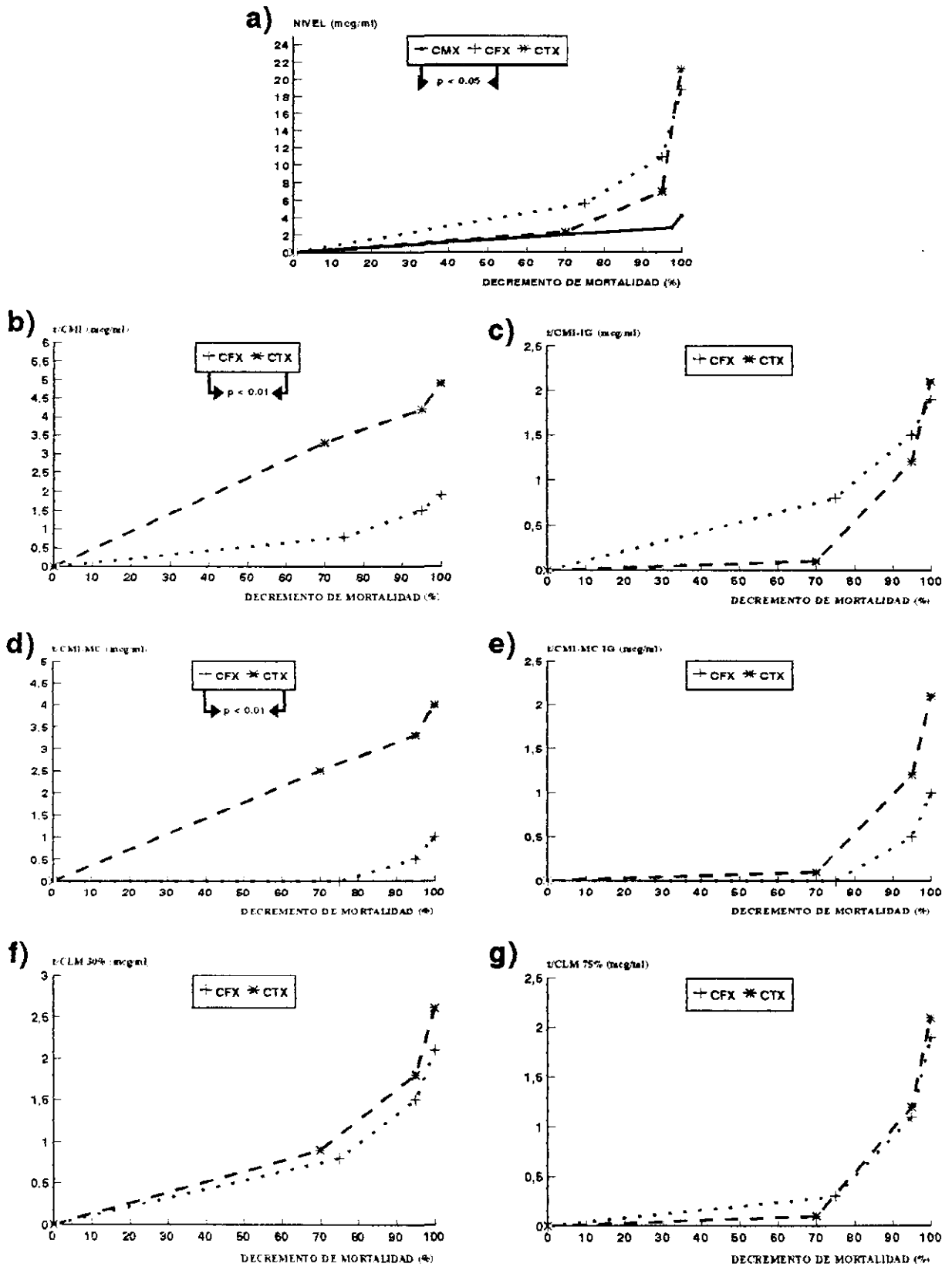
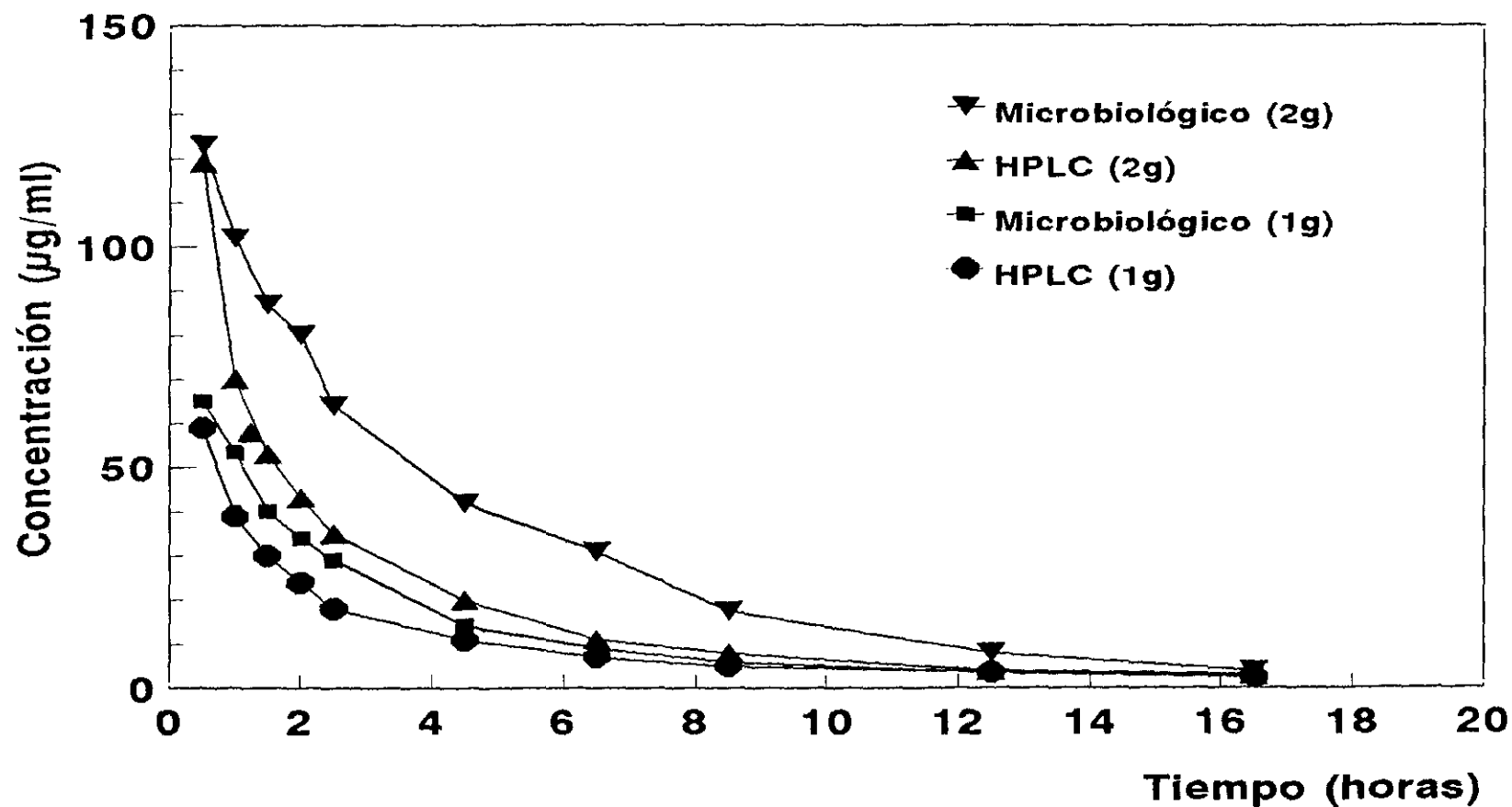


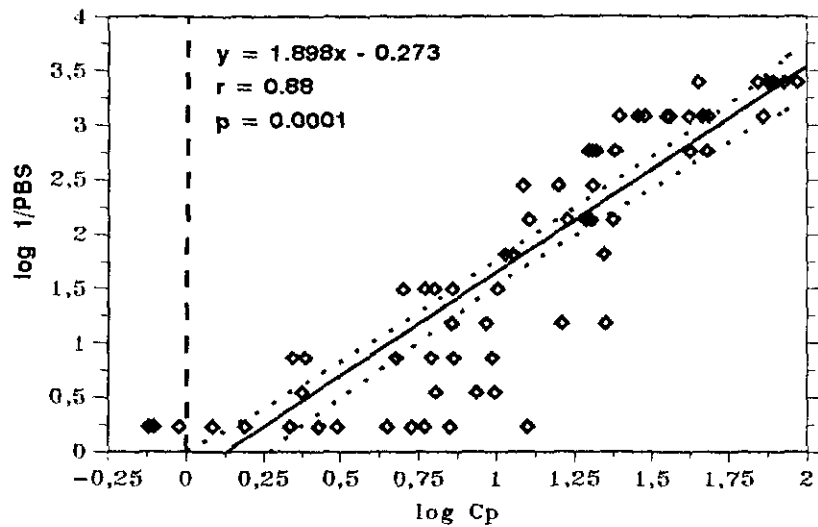
GRAFICO 13. CONCENTRACION PLASMATICA EN HUMANOS DE CMX



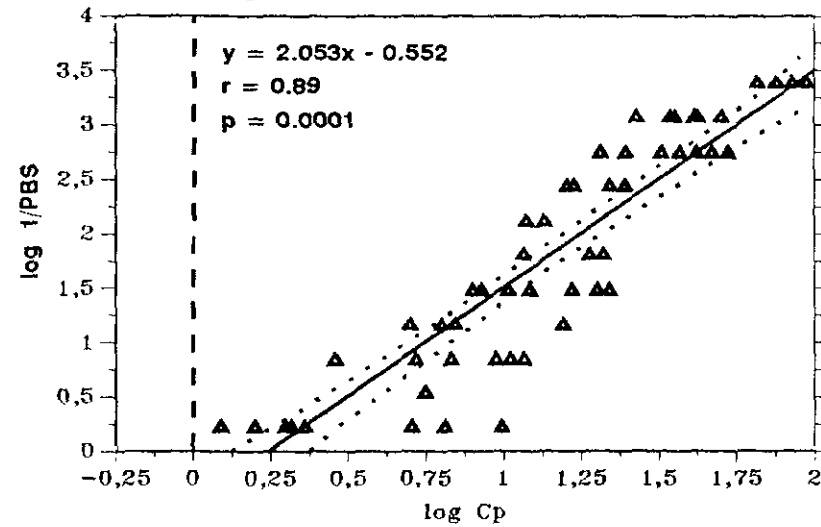
Tomado de la publicación correspondiente a la cita 145 (Aguilar, L.; Esteban, C.; Frías, J.; Balcabao, I.P.; Carcas, A. and Dal-Ré, R., 1993) y del poster correspondiente a la cita 144 (Esteban, C.; Ibañez, C.; Macía, M.A. y Aguilar, L., 1990)

GRAFICO 14. RELACION NIVEL SERICO - PBS

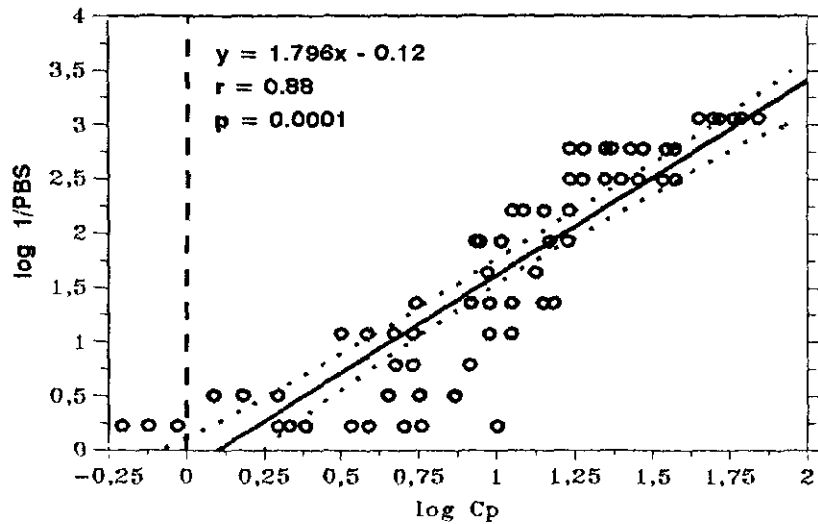
E. coli ATCC 25992



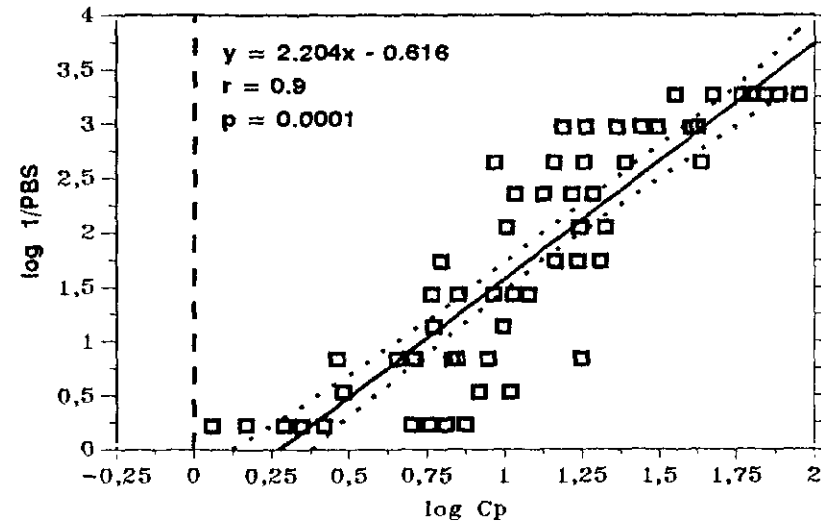
K. pneumoniae ATCC 13833



S. marcescens ATCC 8100

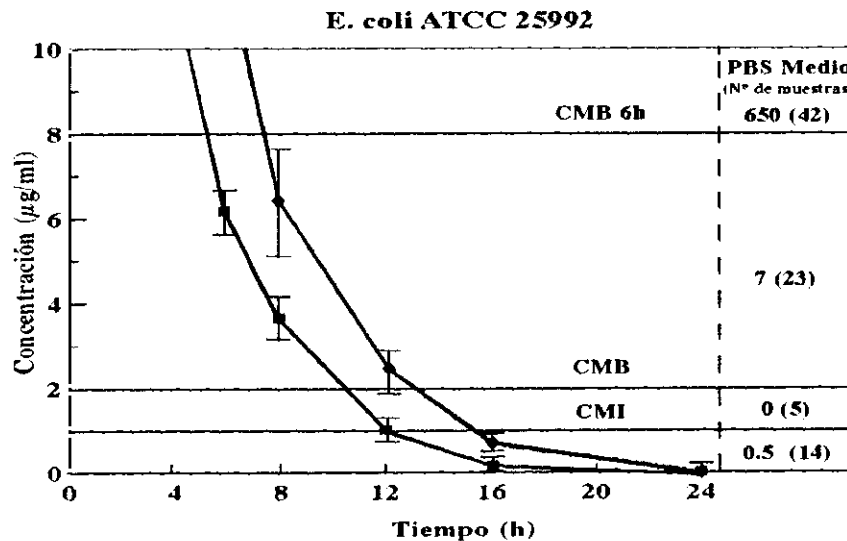
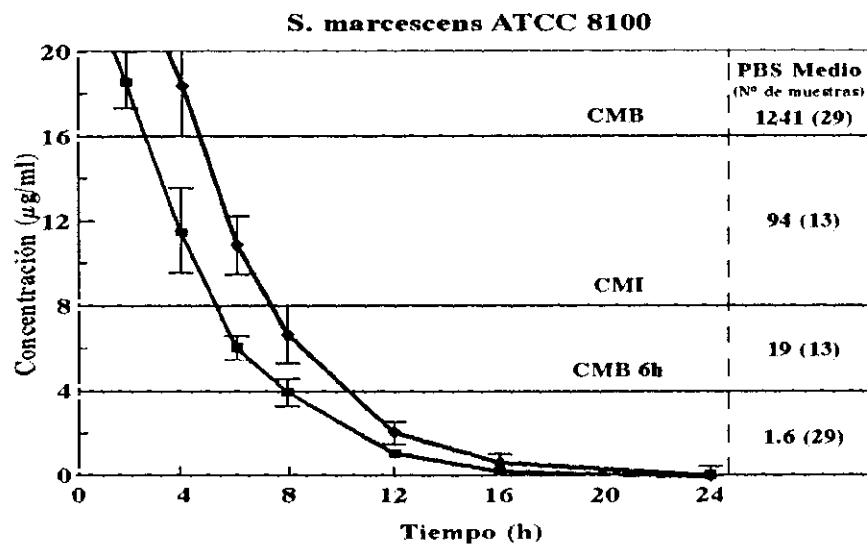
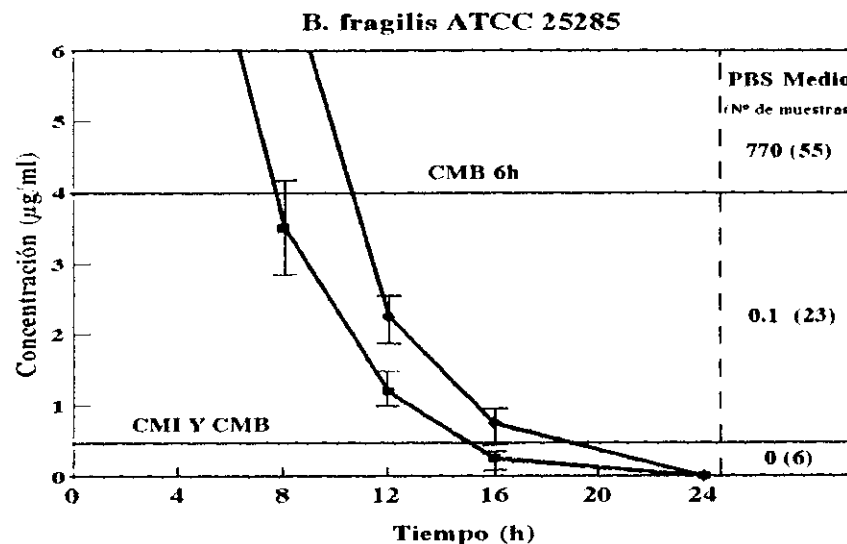
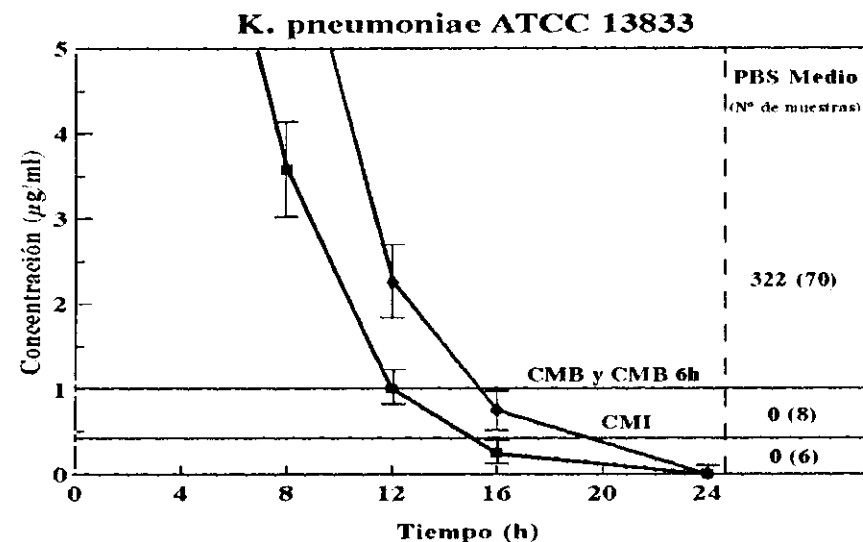


B. fragilis ATCC 25285



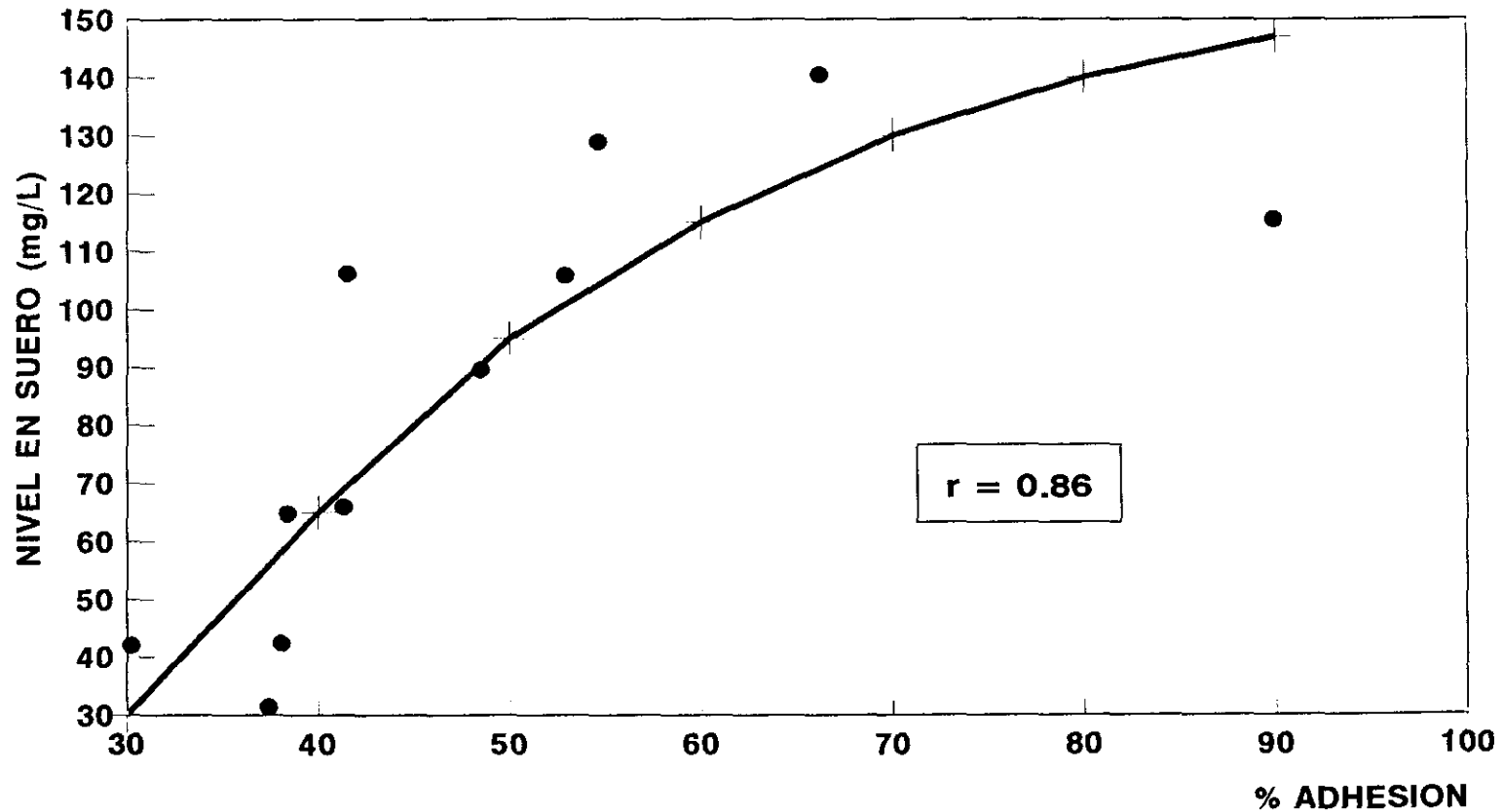
Tomado de la publicación correspondiente a la cita 145 (Aguilar, L.; Esteban, C.; Frías, J.; Balcabao, I.P.; Carcas, A. and Dal-Ré, R., 1993).

GRAFICO 15. CORRELACION FARMACOCINETICA, FARMACODINAMICA Y MICROBIOLOGICA DE CMX EN HUMANOS



Tomado del poster correspondiente a la cita 144 (Esteban, C.; Ibañez, C.; Macia, M.A. y Aguilar, L., 1990).

**GRAFICO 16. RELACION NIVELES EN SUERO
CON ADHESION DE LEVADURAS EN PMN**



Tomado de la presentación correspondiente a la cita número 10
(Corrales, I.; Aguilar, L.; Mato, R.; Frías, J.; Esteban, C. and Prieto, J., 1991).