

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología



**PAPEL DE MOXIFLOXACINO Y AMPICILINA
FRENTE A *Listeria monocytogenes* EN LA
INFECCIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO
CENTRAL**

TESIS DOCTORAL

María Inmaculada Pupo Ledo

Sevilla, 2015

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología



**PAPEL DE MOXIFLOXACINO Y AMPICILINA
FRENTE A *Listeria monocytogenes* EN LA
INFECCIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO
CENTRAL**

Tesis que para aspirar al grado de Doctora en Medicina, presenta la Licenciada Doña María
Inmaculada Pupo Ledo.

Sevilla, 2015



Departamento de Microbiología

D. Javier Aznar Martín, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Sevilla y D. José Antonio Lepe Jiménez, Jefe de Sección del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

CERTIFICAN:

que el presente trabajo de investigación, titulado: PAPEL DE MOXIFLOXACINO Y AMPICILINA FRENTE A *Listeria monocytogenes* EN LA INFECCIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL, constituye la Memoria presentada por María Inmaculada Pupo Ledo para aspirar al grado de Doctora en Medicina, y ha sido realizado bajo nuestra dirección considerando que reúne los requisitos necesarios para su presentación.

Y para que conste, expedimos y firmamos el presente certificado en Sevilla, a 23 de Marzo de 2015.

Fdo. Dr. D. Javier Aznar Martín

Fdo. Dr. D. José Antonio Lepe Jiménez

Agradecimientos

En primer lugar quiero dar mi agradecimiento a mis dos directores de Tesis, Dr. Javier Aznar Martín y Dr. Jose Antonio Lepe Jiménez, por la oportunidad de realizar este trabajo, su apoyo tanto a nivel profesional como personal, su profesionalidad, confianza, y por su paciencia. Sin vosotros nada de esto hubiese sido posible.

También quiero agradecer a los integrantes del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Dr. Fernando Docobo Pérez, Dr. Juan Domínguez Herrera, Dr. Younes Smani, Raquel Parra Millán, Gema Labrador Herrera, por sus enseñanzas y ayuda en la realización de los experimentos que llevé a cabo en este trabajo de investigación.

Finalmente mi agradecimiento a todas aquellas personas que me animaron a seguir adelante, confiando en mí, incluso en los momentos que ni yo misma lo hacía.

Tenéis toda mi gratitud y afecto.

A mis padres

ÍNDICES

1	Introducción.....	15
2	Justificación e Hipótesis de trabajo.....	31
3	Objetivos.....	34
4	Material y métodos.....	36
4.1	Aislamientos bacterianos.....	36
4.2	Antibióticos	36
4.3	Medios de cultivo.....	37
4.4	Actividad antimicrobiana extracelular.....	37
4.4.1	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	37
4.4.2	Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB)	39
4.5	Estudio farmacocinético y farmacodinámico (PK/PD)	40
4.5.1	Cálculo de la concentración máxima (C_{max}) de moxifloxacino y ampicilina en líquido cefalorraquídeo (LCR) mediante simulación de Monte Carlo	40
4.5.2	Evaluación PK/PD de la actividad de moxifloxacino en LCR mediante simulación de Monte Carlo	41
4.5.3	Evaluación PK/PD de la actividad de ampicilina en LCR mediante simulación de Monte Carlo	43
4.6	Selección de los aislamientos para los estudios de actividad antimicrobiana intra y extracelular.....	44
4.7	Actividad antimicrobiana extracelular. Curvas de tiempo-muerte.....	45

4.8	Actividad antimicrobiana intracelular	48
4.8.1	Aislamientos bacterianos y condiciones de crecimiento	48
4.8.2	Cultivo e infección de las células humanas	48
4.8.3	Valoración de la actividad intracelular	49
5	Resultados	52
5.1	Actividad antimicrobiana extracelular. Microdilución en caldo	52
5.1.1	Determinación de la CMI y CMB.....	52
5.1.2	Estudio de la CMI y CMB por serotipos	64
5.1.2.1	Moxifloxacino	64
5.1.2.2	Ampicilina	67
5.1.3	Estudio de la CMI y CMB por clones epidémicos (EC) vs no epidémicos 69	
5.1.3.1	Moxifloxacino	69
5.1.3.2	Ampicilina	71
5.1.4	Estudio de la CMI y CMB de los pulsotipos (PFGE) más importantes 74	
5.1.4.1	Moxifloxacino	74
5.1.4.2	Ampicilina	75
5.2	Estudio PK/PD	77
5.2.1	Cálculo de la C_{max} de moxifloxacino en LCR por simulación de Monte Carlo 77	

5.2.2	Cálculo de la C_{max} de ampicilina en LCR por simulación de Monte Carlo	78
5.2.3	Análisis PK/PD de la actividad de moxifloxacino en SNC	80
5.2.3.1	Dosis de 400 mg/Kg/día	80
5.2.3.2	Dosis de 800 mg/Kg/día	81
5.2.4	Punto de corte PK/PD para moxifloxacino	82
5.2.5	Análisis PK/PD de la actividad de ampicilina en sistema nervioso central (SNC)	83
5.2.5.1	Dosis de 200 mg/día	83
5.2.5.2	Dosis de 400 mg/día	85
5.3	Actividad antimicrobiana extracelular. Curvas de tiempo-muerte	86
5.3.1	Cepas incluidas en el estudio	86
5.3.2	Actividad extracelular de moxifloxacino	87
5.3.3	Actividad extracelular de ampicilina	100
5.3.4	Actividad extracelular de ampicilina más moxifloxacino	112
5.4	Actividad antimicrobiana intracelular	125
5.4.1	Moxifloxacino	125
5.4.2	Ampicilina	130
6	Discusión	137
7	Bibliografía	153

Índice de figuras

Figura 1. Histograma de la distribución de valores de CMI de moxifloxacino en las 150 cepas.	62
Figura 2. Histograma de la distribución de valores de CMB de moxifloxacino en las 150 cepas.	63
Figura 3. Histograma de la distribución de valores de CMI de ampicilina en las 150 cepas.	63
Figura 4. Histograma de la distribución de valores de CMB de ampicilina en las 150 cepas.	64
Figura 5. Distribución de la C_{max} de moxifloxacino en LCR a dosis de 400 mg/día i.v.	77
Figura 6. Distribución de la C_{max} de moxifloxacino en LCR a dosis de 800 mg/día i.v.	78
Figura 7. Distribución de la C_{max} de ampicilina en LCR a dosis de 200 mg/Kg/día i.v.	79
Figura 8. Distribución de la C_{max} de ampicilina en LCR a dosis de 400 mg/Kg/día i.v.	79
Figura 9. Probabilidad de alcanzar el objetivo AUC/MIC a dosis de 400 mg/día i.v. de moxifloxacino.	80
Figura 10. Probabilidad de alcanzar el objetivo AUC/MIC a dosis de 800 mg/día i.v. de moxifloxacino.	82

Figura 11. Cálculo del punto de corte PK/PD de moxifloxacino en LCR en función de la dosis.....	83
Figura 12. Probabilidad de alcanzar el objetivo C _{max} /C _M B a dosis de 200 mg/Kg/día i.v. de ampicilina.....	84
Figura 13. Probabilidad de alcanzar el objetivo C _{max} /C _M B a dosis de 400 mg/Kg/día i.v. de ampicilina.....	85
Figura 14. Recuento logarítmico de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacino de la cepa 60.....	93
Figura 15. Recuento logarítmico de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacino de la cepa 28.....	93
Figura 16. Recuento logarítmico de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacino de la cepa 79.....	93
Figura 17. Recuento logarítmico de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacino de la cepa 118.....	94
Figura 18. Recuento logarítmico de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacino de la cepa 49.....	94
Figura 19. Recuento logarítmico de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacino de la cepa 57.....	94
Figura 20. Área bajo la curva de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacino de la cepa 60.....	98
Figura 21. Área bajo la curva de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacino de la cepa 28.....	98

Figura 22. Área bajo la curva de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacino de la cepa 79.	99
Figura 23. Área bajo la curva de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacino de la cepa 118.	99
Figura 24. Área bajo la curva de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacino de la cepa 49.	99
Figura 25. Área bajo la curva de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacino de la cepa 57.	100
Figura 26. Recuento logarítmico de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina de la cepa 60.	106
Figura 27. Recuento logarítmico de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina de la cepa 28.	106
Figura 28. Recuento logarítmico de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina de la cepa 79.	106
Figura 29. Recuento logarítmico de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina de la cepa 118.	107
Figura 30. Recuento logarítmico de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina de la cepa 49.	107
Figura 31. Recuento logarítmico de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina de la cepa 57.	107
Figura 32. Área bajo la curva de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina de la cepa 60.	110

Figura 33. Área bajo la curva de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina de la cepa 28.	110
Figura 34. Área bajo la curva de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina de la cepa 79.	110
Figura 35. Área bajo la curva de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina de la cepa 118.	111
Figura 36. Área bajo la curva de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina de la cepa 49.	111
Figura 37. Área bajo la curva de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina de la cepa 57.	111
Figura 38. Recuento logarítmico de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte de la cepa 60.	118
Figura 39. Recuento logarítmico de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte de la cepa 28.	118
Figura 40. Recuento logarítmico de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte de la cepa 79.	119
Figura 41. Recuento logarítmico de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte de la cepa 118.	119
Figura 42. Recuento logarítmico de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte de la cepa 49.	119
Figura 43. Recuento logarítmico de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte de la cepa 57.	120

Figura 44. Área bajo la curva de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte de la cepa 60.	123
Figura 45. Área bajo la curva de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte de la cepa 28.	123
Figura 46. Área bajo la curva de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte de la cepa 79.	123
Figura 47. Área bajo la curva de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte de la cepa 118.	124
Figura 48. Área bajo la curva de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte de la cepa 49.	124
Figura 49. Área bajo la curva de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte de la cepa 57.	124
Figura 50. Recuento bacteriano de la actividad intracelular de moxifloxacino a la hora y a las 24 horas a diferentes concentraciones de la cepa 79.	127
Figura 51. Recuento bacteriano de la actividad intracelular de moxifloxacino a la hora y a las 24 horas a diferentes concentraciones de la cepa 118.	128
Figura 52. Recuento bacteriano de la actividad intracelular de moxifloxacino a la hora y a las 24 horas a diferentes concentraciones de la cepa 57.	128
Figura 53. Recuento bacteriano de la actividad intracelular de moxifloxacino a la hora y a las 24 horas a diferentes concentraciones de la cepa 60.	128
Figura 54. Recuento bacteriano de la actividad intracelular de moxifloxacino a la hora y a las 24 horas a diferentes concentraciones de la cepa 28.	129

Figura 55. Recuento bacteriano de la actividad intracelular de moxifloxacino a la hora y a las 24 horas a diferentes concentraciones de la cepa 49.....	129
Figura 56. Recuento bacteriano de la actividad intracelular de ampicilina a la hora y a las 24 horas a diferentes concentraciones de la cepa 79.....	132
Figura 57. Recuento bacteriano de la actividad intracelular de ampicilina a la hora y a las 24 horas a diferentes concentraciones de la cepa 118.....	133
Figura 58. Recuento bacteriano de la actividad intracelular de ampicilina a la hora y a las 24 horas a diferentes concentraciones de la cepa 57.....	133
Figura 59. Recuento bacteriano de la actividad intracelular de ampicilina a la hora y a las 24 horas a diferentes concentraciones de la cepa 60.....	133
Figura 60. Recuento bacteriano de la actividad intracelular de ampicilina a la hora y a las 24 horas a diferentes concentraciones de la cepa 28.....	134
Figura 61. Recuento bacteriano de la actividad intracelular de ampicilina a la hora y a las 24 horas a diferentes concentraciones de la cepa 49.....	134

Índice de tablas

Tabla 1. Características de las cepas seleccionadas para los estudios de actividad antimicrobiana intra y extracelular.....	45
Tabla 2. Valores modales de CMI y CMB para moxifloxacino y ampicilina.	53
Tabla 3. Serotipo, pulsotipo, CMI y CMB de moxifloxacino y ampicilina de las cepas estudiadas.....	54
Tabla 4. Distribución de los valores de CMI de moxifloxacino en relación con los serotipos.....	65
Tabla 5. Distribución de los valores de CMB de moxifloxacino en relación con los serotipos.	66
Tabla 6. Distribución de los valores de CMI de ampicilina en relación con los serotipos.	67
Tabla 7. Distribución de los valores de CMB de ampicilina en relación con los serotipos.....	68
Tabla 8. Distribución de los valores de CMI de moxifloxacino en relación con los clones epidémicos.	69
Tabla 9. Distribución de los valores de CMB de moxifloxacino en relación con los clones epidémicos.....	70
Tabla 10. Distribución de los valores de CMI de ampicilina en relación con los clones epidémicos.	71
Tabla 11. Distribución de los valores de CMB de ampicilina en relación con los clones epidémicos.	72

Tabla 12. Distribución de los valores de CMI de moxifloxacino en relación con los pulsotipos P53 y P9.....	74
Tabla 13. Distribución de los valores de CMB de moxifloxacino en relación con los pulsotipos P53 y P9.....	75
Tabla 14. Distribución de los valores de CMI de ampicilina en relación con los pulsotipos P53 y P9.	75
Tabla 15. Distribución de los valores de CMB de ampicilina en relación con los pulsotipos P53 y P9.	76
Tabla 16. Probabilidad de alcanzar el objetivo AUC/MIC a dosis de 400 mg/día i.v. de moxifloxacino en función de la CMI.....	81
Tabla 17. Probabilidad de alcanzar el objetivo AUC/MIC a dosis de 800 mg/día i.v. de moxifloxacino en función de la CMI.....	82
Tabla 18. Probabilidad de alcanzar el objetivo Cmax/CMB a dosis de 200 mg/Kg/día i.v. de ampicilina en función de la CMI.	84
Tabla 19. Probabilidad de alcanzar el objetivo Cmax/CMB a dosis de 400 mg/Kg/día i.v. de ampicilina en función de la CMI.	86
Tabla 20. Cepas representativas de las 150 cepas estudiadas.	86
Tabla 21. Recuento bacteriano de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacino.	88
Tabla 22. Recuento logarítmico de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacino.	89
Tabla 23. Reducción logarítmica de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacino.	91

Tabla 24. Reducción logarítmica media de las 6 cepas representativas a moxifloxacino.....	92
Tabla 25. Área bajo la curva de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacino.	96
Tabla 26. Área bajo la curva media de las 6 cepas representativas a moxifloxacino.....	97
Tabla 27. Recuento bacteriano de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina.....	101
Tabla 28. Recuento logarítmico de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina.....	102
Tabla 29. Reducción logarítmica de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina.....	104
Tabla 30. Reducción logarítmica media de las 6 cepas representativas a ampicilina.....	105
Tabla 31. Área bajo la curva de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina.	108
Tabla 32. Área bajo la curva de las 6 cepas representativas a ampicilina.	109
Tabla 33. Recuento bacteriano de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte.	113
Tabla 34. Recuento logarítmico de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte.	114
Tabla 35. Reducción logarítmica de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte.	116

Tabla 36. Reducción logarítmica media de las 6 cepas representativas a ambos antibióticos.....	117
Tabla 37. Área bajo la curva de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte.	121
Tabla 38. Área bajo la curva media de las 6 cepas representativas a ambos antibióticos.....	122
Tabla 39. Recuento bacteriano inicial y porcentaje de reducción de la actividad intracelular de moxifloxacino.....	126
Tabla 40. Porcentaje de reducción del recuento bacteriano inicial y tras 1 hora de actividad intracelular de moxifloxacino a dos concentraciones distintas.....	126
Tabla 41. Media de reducción en el crecimiento de las seis cepas tratadas con moxifloxacino.....	130
Tabla 42. Recuento bacteriano y porcentaje de reducción de la actividad intracelular de ampicilina.	131
Tabla 43. Porcentaje de reducción del recuento bacteriano inicial y tras 1 hora de actividad intracelular de ampicilina a dos concentraciones distintas.	131
Tabla 44. Media de reducción en el crecimiento de las seis cepas tratadas con ampicilina.	135

INTRODUCCIÓN

1 Introducción

La listeriosis, cuyo agente etiológico es *Listeria monocytogenes*, es una enfermedad rara incluida en ORPHANET, el sistema de información europeo de referencia en enfermedades raras y medicamentos huérfanos, con la referencia ORPHA533. Por tanto, *L. monocytogenes* es causa poco frecuente de enfermedad en la población general, sin embargo, en algunos grupos poblacionales como: ancianos, inmunodeprimidos, receptores de trasplante y otros individuos con alteraciones de la inmunidad celular, este microorganismo es una importante causa de bacteriemia y meningoencefalitis.

El género *Listeria* está constituido por bacilos grampositivos cortos, regulares y de extremos redondeados, con una longitud entre 1-2 μm y un diámetro entre 0,4-0,5 μm . Su movilidad depende de la temperatura, todas las especies de *Listeria* poseen de 2 a 6 flagelos peritricos en su superficie cuando crecen a temperaturas menores a 30°C, siendo reprimidos a temperaturas de 37°C, condición necesaria para la completa virulencia de la bacteria. Son bacterias anaerobias facultativas y no tienen capacidad de formar cápsula ni esporas. En medios de cultivo sólidos ricos en nutrientes, y tras una incubación de 24-48 horas a 37°C, forman colonias redondas, translúcidas y ligeramente convexas, con un diámetro entre 0,5-1,5 μm .

Listeria puede cultivarse bien en medios generales como agar sangre y agar infusión cerebro corazón (BHI).

Los límites de temperatura de crecimiento se encuentran entre 0 y 45°C, pudiendo crecer, por tanto, a temperaturas de refrigeración. El rango de pH permisivo para *L. monocytogenes* se encuentra definido entre 5 y 9, tolerando medios con una concentración de 10% de cloruro sódico (1).

Debido a su ubicuidad, *L. monocytogenes* se puede incorporar fácilmente a la cadena alimentaria a través de las materias primas utilizadas en la elaboración de alimentos, constituyendo un problema emergente para la industria alimentaria, que ha dado lugar en los países desarrollados a un aumento de la incidencia y a brotes asociados al consumo de alimentos contaminados. El control de *L. monocytogenes* en las plantas de procesado conlleva una gran dificultad, siendo prioritario en los planes de análisis de peligros y puntos de control críticos (2).

El género *Listeria* incluye a 10 especies reconocidas: *L. monocytogenes*, *Listeria grayi*, *Listeria innocua*, *Listeria welschimeri*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria marthii*, *Listeria rocourtiae*, *Listeria fleischmannii* y *Listeria weihenstephanensis* (2 bis), de las cuales, sólo *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* han sido descritas en patología humana (3). Sin embargo, *L. ivanovii* infecta casi exclusivamente a rumiantes, rara vez ha sido descrita en humanos (4) y no se ha determinado que sea capaz de difundir al Sistema Nervioso Central (SNC), por lo tanto *L.*

monocytogenes es la única especie que provoca infección del SNC, tanto en humanos como en rumiantes domésticos (5, 6).

La listeriosis es una de las enfermedades de transmisión alimentaria con mayor tasa de mortalidad, lo que hace que sea considerada una enfermedad prioritaria tanto a nivel de salud pública humana como de sanidad animal. La infección, que se produce a nivel mundial, es una enfermedad de declaración obligatoria en Europa, al igual que en España desde el año 2007; aunque en Andalucía ya lo era desde 1997. Si bien, la listeriosis ocurre infrecuentemente (0,3 casos/100.000 habitantes) en el total de la población de la Unión Europea (UE) (7); en 2011, 26 miembros de la UE informaron 1476 casos confirmados de listeriosis en humanos, alcanzando unas tasas promedio de hospitalización del 93.6%, llegando a ser la zoonosis con mayor requerimiento de hospitalización en Europa. En un informe conjunto de 19 países miembros de la UE, se documentó un total de 134 muertes sobre 1054 casos confirmados en los que se recogió dicha información, calculándose una tasa de mortalidad de un 12.7%. En ese mismo año se informaron tres brotes alimentarios causados por *L. monocytogenes* en Europa, afectando a un total de 16 personas (11 de ellas en un solo brote). Todos los casos requirieron hospitalización, y cuatro de ellos murieron a causa de la infección (8). Los últimos datos publicados en Andalucía corresponden a 2010, donde se declararon 50 nuevos casos, con una tasa de 0,60 casos/100.000 habitantes, el doble que el declarado en la población europea, incrementándose respecto a los 0,54 casos/100.000

habitantes del periodo 2003-2009 (datos obtenidos del boletín del SVEA Vol. 16, nº 30, 29 de julio de 2011). Además, la incidencia y número de casos de la enfermedad en mayores de 65 años es, en general, 2,5 veces mayor que en otros grupos (7), existiendo una asociación importante entre la enfermedad y algunas patologías de base (neoplasias y trasplantados) (9).

La infección, con la excepción de los neonatos, se adquiere por la ingesta de alimentos contaminados. *L. monocytogenes* atraviesa la mucosa intestinal por endocitosis activa de las células epiteliales y posteriormente se disemina por vía hematógica, principalmente al SNC (10). La listeriosis en adultos está típicamente asociada (50-70% de los casos) con infección del SNC en forma de meningitis y, más a menudo de meningoencefalitis, generalmente asociadas a bacteriemia. Las características clínicas de la meningitis por *L. monocytogenes* difiere de las causadas por otras bacterias al presentar un curso subagudo, generalmente con sintomatología de más de 24 horas a la admisión, y asociada a mareos y alteraciones en el nivel de consciencia (11).

La capacidad de *L. monocytogenes* de causar tanto meningitis aguda como infección del parénquima cerebral, diferencia a ésta de otras bacterias frecuentemente causantes de meningitis como son *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae*, y la asemeja a las infecciones producidas por *Mycobacterium tuberculosis* (12). Asimismo, más de una cuarta parte de las encefalitis afectan al tronco cerebral

(romboencefalitis) aunque esta situación probablemente esté inestimada (13, 14).

Los abscesos en cerebro o cerebelo son manifestaciones menos frecuentes de infección del SNC. En una pequeña proporción de las infecciones del SNC por *L. monocytogenes*, alrededor del 10% (la mitad de las cuales producidas en pacientes inmunodeprimidos), aparecen abscesos cerebrales macroscópicos localizados en áreas subcorticales, tálamo o médula espinal sin compromiso meníngeo (15). Estas localizaciones inusuales parecen patognomónicas de infección por *L. monocytogenes* (16).

La mortalidad de la infección del SNC varía entre el 20 y el 60%, dependiendo del grado y evolución de la infección así como de la enfermedad de base del paciente. En algunos grupos de riesgo, como los pacientes con neoplasias, *L. monocytogenes* es la primera causa de meningitis bacteriana (11).

Los mecanismos a través de los cuales *L. monocytogenes* accede al SNC son poco conocidos, pero en base a observaciones *in vitro* e *in vivo* parece que existen dos posibles rutas implicadas. Una ruta neuronal retrógrada a través del epitelio oral y probablemente asociada a la enfermedad en rumiantes y que justificaría la romboencefalitis como la principal manifestación de infección del SNC en estos animales, en contraste con la enfermedad en humanos donde la ruta es por vía hematológica a través de los leucocitos circulantes que cruzarían la barrera

hematoencefálica y justificaría la meningoencefalitis como forma clínica principal (17).

El primer caso conocido de infección del SNC por *L. monocytogenes* fue descrito en 1918 en un soldado que murió de meningitis. Este caso fue publicado en 1921 (18) antes de la caracterización de esta nueva especie bacteriana por Murray y sus colaboradores en 1926 a partir de estudios en animales de laboratorio (19). Sin embargo, no fue hasta la segunda mitad del siglo XX cuando la infección por *L. monocytogenes* se consideró una enfermedad humana importante, concomitante con los cambios en los hábitos alimenticios y la introducción de los tratamientos inmunosupresores.

Generalmente, *L. monocytogenes* es sensible a una amplia variedad de antibióticos y su sensibilidad *in vitro* no ha variado significativamente en las últimas décadas (20). Aunque una gran variedad de antibióticos han demostrado actividad *in vitro* frente a *L. monocytogenes*, ésta no se correlaciona con la eficacia *in vivo* (21). Esto es en parte debido a la naturaleza intracelular de la bacteria, la cual es capaz de sobrevivir y multiplicarse dentro de las células del huésped, principalmente macrófagos, hepatocitos y neuronas, donde son refractarias al efecto de los antibióticos presentes en el espacio extracelular. Además, dado que la listeriosis ocurre a menudo en pacientes con cáncer, se puede asumir que no solo los macrófagos y las células del parénquima, sino también las células tumorales podrían ser invadidas por *L. monocytogenes* y estas células, transformadas

genéticamente, pueden expresar resistencia a diferentes medicamentos citostáticos, incluidos los antibióticos (22).

Actualmente, el tratamiento de la infección por *L. monocytogenes* no tiene en cuenta la localización en el SNC como una situación particular de tratamiento, a diferencia de lo que ocurre con otras bacterias como *S. pneumoniae*; y está basado en una combinación de dosis altas de ampicilina asociada a gentamicina por vía intravenosa (i.v.) (23). La evidencia más importante de este efecto sinérgico entre ambos antibióticos proviene del trabajo clásico de Scheld et al. (año 1979) donde comparaban penicilina, ampicilina, rifampicina y gentamicina en diversas combinaciones en un modelo experimental de meningitis en conejos, y donde demostraban que la asociación de ampicilina + gentamicina era el tratamiento más efectivo (24). A lo anterior, hay que añadir, que no existen ensayos clínicos controlados (debido a la baja prevalencia de la enfermedad) que establezcan el antibiótico de elección en el tratamiento de la listeriosis. Los datos que se manejan provienen de estudios de sensibilidad *in vitro*, estudios en modelos animales y la experiencia clínica (generalmente con un bajo número de pacientes), lógicamente, estas recomendaciones están sujetas a la interpretación y a la preferencia individual. Aun así, la Infectious Diseases Society of America (IDSA) otorga a la combinación de ampicilina + gentamicina un nivel de evidencia A-III para el tratamiento de la encefalitis por *L. monocytogenes* (25).

Sin embargo, a pesar de usar el tratamiento de elección, la listeriosis se asocia a un alto porcentaje de mortalidad (30%), especialmente cuando la infección compromete el SNC (26). Parte de estos problemas podría radicar en que los antibióticos betalactámicos, son solo bacteriostáticos para la mayoría de los aislamientos (27), ya que existe una gran diferencia entre la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB), al menos con la valoración de la sensibilidad a las 24 horas. En consecuencia, debe considerarse a *L. monocytogenes* tolerante a todos los agentes betalactámicos, aunque puedan llegar a convertirse en bactericidas después de una exposición prolongada (28). Esto es cierto para la mayoría (alrededor del 90%) de los aislados, especialmente cuando las bacterias se estudian en fase estacionaria.

La naturaleza intracelular de *L. monocytogenes* y lo anteriormente expuesto, sugieren que los métodos convencionales de estudio de la sensibilidad a los antibióticos *in vitro* no parecen los más adecuados, por lo que el estudio de la eficacia de los antibióticos en cultivos celulares podría ser una mejor aproximación para valorar el potencial terapéutico (23). Más aún, cuando en los modelos animales no pueden reproducir eficazmente la listeriosis humana.

La meningitis producida en conejos es hipervirulenta, por lo cual la mayoría de *L. monocytogenes* mueren extracelularmente. En modelos murinos de infección sistémica, *L. monocytogenes* se localiza principalmente en el interior de macrófagos y células parenquimatosas del hígado y bazo,

donde son fácilmente accesibles a los antibióticos como ampicilina o gentamicina. Asimismo, la eficacia terapéutica depende del modelo usado, por ejemplo, la combinación de ampicilina más gentamicina actúa sinérgicamente en el modelo de meningitis de conejo pero no en el de ratón (21).

Por todo lo anterior, el manejo antibiótico de la infección intracelular por *L. monocytogenes* es un tema complejo, cuyo resultado depende de una rápida administración de antibióticos con actividad bactericida y que sean capaces de difundirse en tejidos (principalmente el parénquima cerebral). Además, la eficacia del tratamiento está limitada por la formación de reservorios de bacterias intracelulares dentro del compartimento citoplasmático de muchos tipos de células eucariotas, incluyendo macrófagos (29, 30, 31), proponiéndose por muchos investigadores la necesidad de emplear antibióticos capaces de penetrar y acumularse en las células. En este contexto, las quinolonas podrían ser consideradas antibióticos ideales. Estos antibióticos reúnen características muy importantes: excelente farmacocinética, actividad bactericida, alta penetración en líquido cefalorraquídeo (LCR), y una gran capacidad de acumulación intracelular (32, 33, 34).

Las nuevas fluoroquinolonas como levofloxacin, sparfloxacin, gemifloxacin, y moxifloxacin, son bactericidas frente a *L. monocytogenes* (35). Estos antibióticos pueden lograr un efecto bactericida superior al 99.9% sin evidencia de recrecimiento bacteriano posterior. Sin embargo, es

necesaria una validación de estos antibióticos en condiciones similares a las clínicas para recomendar su uso en pacientes con listeriosis, principalmente cuando hay compromiso del SNC (36).

En los últimos años, una serie de comunicaciones y estudios ponen en evidencia la efectividad de moxifloxacino en el tratamiento de la listeriosis. Este aspecto es hasta cierto punto paradójico en un microorganismo que es intrínsecamente resistente al ácido nalidíxico y que muestra una sensibilidad disminuida a otras fluoroquinolonas, como ciprofloxacino (37, 38). Por otro lado, el interés por este antibiótico a nivel europeo para el tratamiento de las infecciones graves, estaba muy limitado debido a la falta de disponibilidad de la formulación intravenosa, aspecto que ha sido superado en 2011 con su comercialización en Europa.

Moxifloxacino es un antibacteriano sintético del grupo de las fluoroquinolonas que muestra actividad *in vitro* contra un amplio espectro de microorganismos grampositivos, gramnegativos y anaerobios. La acción antibacteriana de moxifloxacino resulta de la inhibición de la topoisomerasa II (ADN girasa) y la topoisomerasa IV. La ADN girasa es una enzima esencial que interviene en la replicación, transcripción y reparación del ADN bacteriano. La topoisomerasa IV es una enzima clave en la rotura del ADN cromosómico durante la división celular bacteriana. La presencia de un sustituyente bicicloamina en la posición C-7 de la molécula impide los mecanismos de expulsión activa por parte de los microorganismos (39).

La actividad antibiótica de moxifloxacino es potente ya que concentraciones el doble de la CMI son suficientes para ser bactericida frente a la mayoría de cepas de *Staphylococcus aureus*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae*.

A estas ventajas habría que añadir unas excelentes propiedades farmacocinéticas, como su unión a proteínas séricas que es aproximadamente del 30 a 50%, independientemente de la concentración del fármaco, así como el volumen de distribución de 1,7 a 2,7 L/Kg, que facilita su amplia distribución en todo el organismo, con concentraciones tisulares a menudo superiores a las concentraciones plasmáticas. Además, la penetración de moxifloxacino en LCR varía entre el 70% y el 80% en pacientes con meningitis (40).

De hecho, estudios experimentales han constatado que moxifloxacino ejerce una buena actividad bactericida en LCR frente a cepas de *S. pneumoniae* resistentes a penicilina (41).

Hay pocos trabajos que evalúen la actividad de moxifloxacino frente a *L. monocytogenes*. En dos trabajos de Carryn et al. (38, 42) que comparan la actividad de distintos betalactámicos frente a moxifloxacino y ciprofloxacino a nivel intracelular, demuestran que ciprofloxacino y moxifloxacino fueron mucho más bactericidas que los betalactámicos, mientras que gentamicina se mostró inactiva. Se observó una diferencia en la eficacia de moxifloxacino (reducción de 2.1 log de unidades formadoras de colonias, UFC) frente a

ciprofloxacino, que no parecía estar relacionada con su acumulación a nivel intracelular, similar en ambos fármacos, sino con la diferencia entre los valores de CMI de los dos fármacos frente a *L. monocytogenes*. Un análisis detallado mostró que aunque la concentración de moxifloxacino en LCR fue sólo de un 20 a un 50% de la obtenida en plasma, y que a nivel intracelular moxifloxacino mostraba 1/7 de su actividad a nivel extracelular, la baja CMI de *L. monocytogenes* le permitía ejercer una excelente actividad bactericida.

En otro trabajo de Grayo et al. (43) comparan la actividad *in vitro* de moxifloxacino y ampicilina, mediante curvas de tiempo-muerte e inhibición del crecimiento intracelular en macrófagos infectados por *L. monocytogenes*. Demuestran que tanto moxifloxacino como amoxicilina fueron bactericidas en caldo contra las formas extracelulares de la bacteria. Sin embargo, moxifloxacino fue más rápidamente bactericida, comenzando a ejercer sus efectos en las primeras 3 horas, y logrando la esterilización completa del caldo a las 24 horas de incubación. Además, moxifloxacino presentó un rápido efecto bactericida a nivel intracelular, mientras que amoxicilina fue sólo bacteriostática. Adicionalmente aquel previno la lisis celular, la posterior propagación bacteriana a las células adyacentes, y no seleccionó bacterias resistentes durante los experimentos *in vitro*.

En otro trabajo, el mismo grupo corrobora los resultados anteriores en un modelo murino de infección del SNC (44). La eficacia *in vivo* de moxifloxacino y amoxicilina se comparó mediante ensayos de supervivencia y estudio de la cinética de crecimiento bacteriano en sangre y distintos

órganos. Se constató que la muerte se retrasó significativamente en los animales tratados con una dosis única de moxifloxacino en comparación con una dosis única de amoxicilina. Se observó la rápida eliminación de bacterias en la sangre y órganos de los animales tratados con moxifloxacino, y además, la disminución en los recuentos bacterianos en sangre y tejido cerebral se correlacionó con las concentraciones en plasma y LCR del antibiótico, demostrándose que moxifloxacino atraviesa la barrera hematoencefálica y se difunde en el parénquima cerebral muy rápidamente. Concluyen, que la eficacia *in vivo* de moxifloxacino es consecuencia de su rápida actividad bactericida a nivel intracelular en los distintos focos de infección del SNC, principalmente a nivel de los abscesos cerebrales.

En otro estudio *in vitro*, Seral et al. (45) estudian la actividad de distintas quinolonas frente a formas extracelulares e intracelulares de *L. monocytogenes*, llegando a la conclusión que la actividad de las quinolonas está reducida intracelularmente, de forma que sólo una parte de la concentración del antibiótico acumulado ejerce efecto antibacteriano debido a las condiciones locales o a que las bacterias intracelulares responden de forma escasa a las quinolonas. No obstante, moxifloxacino fue con el que se obtuvo mejor resultado con reducciones de 2 log sobre los recuentos bacterianos iniciales.

Sin embargo, en otro trabajo experimental de Sipahi et al. (46), donde comparan moxifloxacino versus (vs.) ampicilina más gentamicina en un modelo de meningitis experimental en conejos, se muestra que la actividad

de ambos tratamientos fue similar. Aunque, los mismos autores reconocen que el modelo de meningitis en conejo no refleja adecuadamente el proceso fisiopatológico en humanos.

De todo lo anterior, se deduce que las pruebas de sensibilidad *in vitro* no tienen en cuenta otras variables biológicas del hospedador infectado que podrían afectar al resultado clínico. Además, evaluando los trabajos anteriores, se observa que el problema fundamental de todos ellos es que realizan los estudios con una sola cepa de colección que lógicamente no refleja el universo de *L. monocytogenes* con capacidad de producir infección; no teniendo en cuenta la virulencia de los aislamientos, y no efectuando las pruebas *in vitro* en condiciones de expresión similares a las encontradas *in vivo* y con una CMI representativa del peor escenario (CMI₉₀), además de no considerar las concentraciones teóricas del antibiótico presentes en LCR, aspecto relevante para otras bacterias grampositivas como *S. pneumoniae*, para la cual, la organización norteamericana “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) y la europea “The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing” (EUCAST) proponen puntos de corte especiales de sensibilidad y resistencia.

En conclusión, el tratamiento de la listeriosis y, más concretamente, de la infección del SNC, presenta facetas no bien resueltas. Asimismo, los métodos de estudio de la efectividad *in vitro* de los antibióticos no parecen correlacionarse con el resultado clínico, en parte por la naturaleza

intracelular de la infección y, por otra, por la no expresión de los factores de virulencia *in vitro* por parte la bacteria.

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO

2 Justificación e Hipótesis de trabajo

La listeriosis es una de las enfermedades de transmisión alimentaria con mayor tasa de mortalidad, normalmente asociada en adultos (50-70% de los casos) con infección del SNC en forma de meningitis, y generalmente con bacteriemia concomitante. La mortalidad de la infección del SNC varía entre el 20 y el 60%, dependiendo del grado y evolución de la infección así como de la enfermedad de base del paciente. Actualmente, el tratamiento de la infección por *L. monocytogenes*, basado en una combinación de dosis altas de ampicilina asociada a gentamicina por vía i.v., no tiene en cuenta la localización en el SNC como un caso particular de tratamiento. La evidencia más importante de este efecto sinérgico entre ambos antibióticos proviene del trabajo clásico de Scheld et al. (año 1979), donde en un modelo experimental de meningitis en conejos, demostraban que la asociación de ampicilina más gentamicina era el tratamiento más efectivo. Sin embargo, a pesar de usar el tratamiento de elección, la listeriosis está asociada a un alto porcentaje de mortalidad (30%), especialmente cuando la infección compromete al SNC.

Debido a la naturaleza intracelular de *L. monocytogenes*, los métodos convencionales de estudio de la sensibilidad a los antibióticos *in vitro* no parecen adecuados, por lo que el estudio de la eficacia de los antibióticos en cultivos celulares podría ser la mejor aproximación para valorar el potencial

terapéutico de los antimicrobianos. Más aún, cuando en los modelos animales no pueden reproducir eficazmente la listeriosis humana.

Moxifloxacino es un potente antimicrobiano que atraviesa la barrera hematoencefálica y difunde en el parénquima cerebral muy rápidamente. Su eficacia *in vivo* es consecuencia de su rápida actividad bactericida a nivel intracelular, y en algunos trabajos, con un número muy reducido de cepas, ha demostrado actividad *in vitro* e *in vivo* en las infecciones del SNC por *L. monocytogenes*.

Por todo lo anteriormente expuesto, nos hemos planteado como hipótesis de trabajo las siguientes:

1. Moxifloxacino es una alternativa terapéutica a ampicilina en el tratamiento de las infecciones del SNC (meningitis) por *L. monocytogenes*.
2. El serotipo y/o la virulencia de los aislamientos de *L. monocytogenes* influyen en la actividad *in vitro* e *in vivo* de los antimicrobianos.

OBJETIVOS

3 Objetivos

La demostración de las hipótesis planteadas, intentaremos obtenerla a partir de la consecución de unos objetivos parciales y secuenciales.

1. Conocer la distribución modal de los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de moxifloxacino y ampicilina frente a una colección de cepas aisladas de casos clínicos, agrupadas por serotipos, clones epidémicos y pulsotipos.
2. Determinar las dosis más adecuadas, mediante simulación de Monte Carlo, para la efectividad/eficacia de moxifloxacino y ampicilina en condiciones de infección del SNC.
3. Estudiar la capacidad bactericida de moxifloxacino y ampicilina mediante curvas de tiempo-muerte en condiciones de infección del SNC, en aislamientos representativos de cada serotipo y de los principales pulsotipos y/o clones epidémicos.
4. Comparar la actividad intracelular de moxifloxacino y ampicilina en condiciones de infección del SNC, con aislamientos representativos de cada serotipo y de los principales pulsotipos y/o clones epidémicos, en un modelo celular de células epiteliales.

MATERIAL Y MÉTODOS

4 Material y métodos

4.1 Aislamientos bacterianos

Se estudió la actividad antimicrobiana de moxifloxacino y ampicilina en una colección de 150 cepas de *L. monocytogenes* aisladas en pacientes con diferentes presentaciones clínicas de enfermedad invasiva humana, pertenecientes al estudio LISAND, un proyecto de colaboración de las Sociedades Andaluzas de Microbiología y Enfermedades Infecciosas sobre formas clínicas, presentación y factores de riesgo de casos de listeriosis en Andalucía. Todas las cepas representan casos de infección en hospitales de Andalucía de 2003 a 2011 (47).

Las cepas estudiadas incluyeron los serotipos 1/2a (25), 1/2b (29), 1/2c (3) y 4b (93). Sesenta y dos cepas pertenecen a los clones epidémicos ECI (43), ECII (10) y ECIII (9).

Todas ellas fueron conservadas en medio glicerol-leche desnatada a 70°C, y subcultivadas para el estudio en medio de agar sangre.

4.2 Antibióticos

Los antibióticos Moxifloxacin hydrochloride y Ampicillin sodium se utilizaron a partir de su presentación en forma de polvo valorado suministrados por Sigma-Aldrich.

Los dos antimicrobianos se diluyeron en suero salino isotónico (Fresenius Kabi) siguiendo las instrucciones del CLSI (48), para obtener soluciones madre a una concentración de 0,979 mg/mL (moxifloxacino) y 0,881 mg/mL (ampicilina), que se distribuyeron en alícuotas de 500 µL, conservándose a -70 °C hasta su utilización.

4.3 Medios de cultivo

- Agar Columbia suplementado con 5% de sangre de carnero (Difco™).
- Caldo Müeller-Hinton suplementado con cationes Ca²⁺ y Mg²⁺ (Sigma-Aldrich).
- Sangre lisada de caballo (Thermo Scientific Oxoid).

4.4 Actividad antimicrobiana extracelular

4.4.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La CMI de moxifloxacino y ampicilina de los 150 aislados bacterianos se determinó por el método de microdilución en caldo propuesto por el CLSI (48).

A partir de un cultivo bacteriano en placas de agar sangre tras 18-24 horas de incubación en atmósfera aerobia a 37°C, se preparó una suspensión en solución salina (0,9%) turbidométricamente ajustada a 0,5 de McFarland que posteriormente se diluyó 1:10 en caldo Müller-Hinton suplementado con un 5% de sangre de caballo para obtener un inóculo con una concentración final de 1×10^7 UFC/mL.

En los pocillos de las placas de microdilución se depositaron 100 µL de caldo Müller-Hinton suplementado con concentraciones crecientes de antibiótico en un rango de 0,03 a 1 mg/L para moxifloxacino y de 0,015 a 4 mg/L para ampicilina. A continuación, se añadió a cada pocillo, incluido el control de crecimiento, 100 µL del inóculo bacteriano, obteniendo una concentración final en el inóculo de 5×10^5 UFC/mL. Se incluyó con cada cepa, como control de esterilidad, un pocillo con 100 µL de caldo libre de antibiótico.

Posteriormente, las placas fueron incubadas en atmósfera aerobia a 37°C, realizándose a las 24 horas de incubación, la lectura de la CMI (49).

Se empleó como control de calidad la cepa de *S. pneumoniae* ATCC 49619.

La CMI se definió como la menor concentración de antimicrobiano, expresada en mg/L, capaz de inhibir el crecimiento visible (turbidez) de la bacteria respecto al pocillo control libre de fármaco.

4.4.2 Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB)

El estudio de la CMB, se realizó mediante metodología CLSI tras la determinación de CMI por microdilución (50).

A partir del pocillo correspondiente al del valor de la CMI hasta el de la máxima concentración estudiada, se sembraron 10 µL del contenido de cada pocillo en placas de agar sangre, se incubaron durante 24 horas en atmósfera aerobia a 37°C, procediéndose posteriormente al recuento de UFC.

La CMB se definió como la concentración más baja que reduce el inóculo inicial en un 99,9%.

Dado que no existen criterios de sensibilidad para moxifloxacino por parte de EUCAST ni CLSI, la sensibilidad se definió según el punto de corte determinado mediante la simulación de Monte Carlo reseñado en el apartado siguiente. Para ampicilina se emplearon criterios EUCAST, considerando sensibles aquellos aislamientos con $CMI \leq 1$ mg/L (51).

4.5 Estudio farmacocinético y farmacodinámico (PK/PD)

4.5.1 Cálculo de la concentración máxima (C_{max}) de moxifloxacino y ampicilina en líquido cefalorraquídeo (LCR) mediante simulación de Monte Carlo

Se realizó una simulación de Monte Carlo sobre 10.000 individuos a fin de calcular la concentración máxima media de moxifloxacino y ampicilina en LCR para dosis i.v. de 400 (dosis estándar) y 800 mg/día (dosis empleada en el tratamiento de la meningitis tuberculosa) de moxifloxacino (12), y para dosis i.v. de ampicilina de 200 y 400 mg/Kg/día, mediante una aplicación construida en Microsoft Excel para un paciente tipo de 70 Kg de peso y función renal normal, en base a la siguiente ecuación PK/PD:

$$C_{max \text{ libre LCR}} = \text{Dosis} \times \text{Biodisponibilidad} / V_{ss}$$

- C_{max} : máxima concentración de antibiótico obtenida en LCR (mg/L)
- Dosis: dosis de antibiótico (mg/Kg)
- Biodisponibilidad: fracción del antibiótico no unida a proteínas capaz de penetrar en LCR
- V_{ss} : volumen de distribución en el estado estacionario (L/Kg).

Los parámetros farmacocinéticos incluidos en los modelos se obtuvieron de datos publicados anteriormente usando el valor medio y su coeficiente de variación (52-56).

En todas las simulaciones, se asumió que todos los parámetros farmacocinéticos en la población se distribuían de forma log-normal. El modelo tuvo en cuenta la penetración en LCR de los antibióticos (57-61).

4.5.2 Evaluación PK/PD de la actividad de moxifloxacino en LCR mediante simulación de Monte Carlo

Debido a que ni CLSI ni EUCAST tienen establecido para *L. monocytogenes* un punto de corte para moxifloxacino, se calculó un punto de corte PK/PD mediante una simulación de Monte Carlo sobre 10.000 individuos con el fin de valorar el éxito de una dosis i.v. de 400 mg/día y otra de 800 mg/día respectivamente, mediante una aplicación construida en Microsoft Excel para un paciente tipo de 70 Kg con función renal normal y considerando como objetivo terapéutico (la diana para *S. pneumoniae*) un cociente de $AUC_{24h, libre}/CMI$ de 35 (62).

Se empleó como ecuación PK-PD:

$$AUC_{24h, libre}/CMI = (D_{24h} / CL) \times \text{biodisponibilidad}/CMI$$

- $AUC_{24h, libre}$: área bajo la curva de la concentración de moxifloxacino frente al tiempo de 0 a 24 horas (AUC_{24h})
- D_{24h} : dosis diaria
- Biodisponibilidad: fracción del antibiótico no unida a proteínas capaz de penetrar en LCR
- CL: aclaramiento total
- CMI: concentración mínima inhibitoria

Los parámetros farmacocinéticos incluidos en el modelo, fueron obtenidos de la literatura usando el valor medio y su coeficiente de variación (54-56).

Se asumió que todos los parámetros PK en la población se distribuían de forma log-normal y los valores CMI se fijaron a valores entre 0,094 y 2 mg/L según la distribución encontrada en el estudio microbiológico indicado en el apartado 4.4.1.

Se consideró como objetivo terapéutico alcanzar un $AUC_{24h, free}/MIC = 35$ (62 bis) en $\geq 90\%$ de las simulaciones.

El punto de corte PK/PD de sensibilidad/resistencia fue definido como la mayor CMI en la cual la probabilidad de obtener el objetivo terapéutico de $AUC_{24h, free}/MIC = 35$ fuera $\geq 90\%$ (63).

4.5.3 Evaluación PK/PD de la actividad de ampicilina en LCR mediante simulación de Monte Carlo

Se realizó una simulación de Monte Carlo sobre 10.000 individuos con el fin de valorar el éxito de una dosis i.v. de 200 y otra de 400 mg/Kg/día de ampicilina respectivamente, mediante una aplicación construida en Microsoft Excel, para un paciente tipo de 70 Kg con función renal normal y considerando como objetivo terapéutico un cociente de $C_{\text{max libre}}/\text{CMB} \geq 10$ (63 bis).

Se empleó como ecuación PK-PD:

$$C_{\text{max libre LCR}} (C_{\text{max}})/\text{CMB} = (\text{Dosis} \times \text{Biodisponibilidad}/V_{\text{ss}})/\text{CMB}$$

- C_{max} : máxima concentración de antibiótico obtenida en LCR (mg/L)
- Dosis: dosis de antibiótico (mg/Kg)
- Biodisponibilidad: fracción del antibiótico no unida a proteínas capaz de penetrar en LCR
- V_{ss} : volumen de distribución en el estado estacionario (L/Kg)
- CMB: concentración mínima bactericida

Los parámetros farmacocinéticos incluidos en el modelo, fueron obtenidos de la literatura usando el valor medio y su coeficiente de variación (52, 53).

Se asumió que todos los parámetros PK en la población se distribuían de forma log-normal y los valores CMB se fijaron a valores entre 0,064 y 8 mg/L según la distribución encontrada en el estudio de microdilución indicado en el apartado 4.4.2.

El punto de corte PK/PD de sensibilidad/resistencia fue definido como el valor de CMB para el cual la probabilidad de obtener el objetivo terapéutico de $C_{\max, \text{libre}}/\text{CMB} = 35$ fuera $\geq 90\%$.

4.6 Selección de los aislamientos para los estudios de actividad antimicrobiana intra y extracelular

La actividad bactericida intra y extracelular de moxifloxacino y ampicilina fue evaluada frente a una cepa de *L. monocytogenes* de cada serotipo de los aislamientos de la serie incluida en el estudio, y una cepa de cada uno de los principales pulsotipos (agrupaciones clonales) y/o clones epidémicos que presentaban una CMI equivalente a la CMI₉₀ (peor escenario desde el punto de vista microbiológico). Un total de seis cepas fueron evaluadas (tabla 1).

Tabla 1. Características de las cepas seleccionadas para los estudios de actividad antimicrobiana intra y extracelular.

Nº de cepa	serotipo	PFGE	EC	CMI	CMI
				ampicilina	moxifloxacino
28	1/2b	P22	-	0,25	0,5
49	4b	P19	ECI	0,5	0,5
57	1/2a	P53	-	0,25	0,5
60	1/2a	P53	ECIII	0,5	0,5
79	4b	P44	ECII	0,25	0,5
118	1/2c	P56	-	0,25	0,5

*EC: clones epidémicos

*PFGE: electroforesis en campo pulsado

4.7 Actividad antimicrobiana extracelular. Curvas de tiempo-muerte

Las curvas de tiempo-muerte se realizaron por triplicado según la metodología descrita por Grayo et al. y Carryn et al. (38, 43, 61).

Se realizó una siembra en placa de agar sangre a partir de una alícuota congelada de *L. monocytogenes* y se incubó a 37°C en atmósfera aerobia durante 24 horas. Tras las 24 horas de incubación se tomaron unas colonias de *Listeria* y se realizó una suspensión a 0,5 McFarland, equivalente a 1×10^8 UFC/mL. Usando la fórmula: $C1 \times V1 = C2 \times V2$, se calculó la cantidad de volumen de esa concentración inicial que habría que añadirle a 20 mL de caldo Müeller-Hinton para obtener una concentración

bacteriana final de 1×10^5 UFC/mL en 20 mL de caldo. En nuestro caso fue de 0,1 mL.

En el caso de moxifloxacino, se inocularon 5×10^5 UFC/mL en 3 tubos con 20 mL de medio de cultivo Müller-Hinton, en cada uno de los cuales se añadieron las siguientes concentraciones de antibiótico: 0,5 mg/L, 1,5 mg/L y 2,28 mg/L, correspondientes a los valores de la CMI así como de los valores de la C_{max} media estimadas en LCR con las dosis de 400 mg/día y 800 mg/día, respectivamente. Como grupo control se inoculó un cuarto tubo sin antibiótico.

En el caso de ampicilina, se inocularon 5×10^5 UFC/mL en 4 tubos con 20 mL de medio de cultivo Müller-Hinton en cada uno de los cuales se añadieron las siguientes concentraciones de antibiótico: 0,5 mg/L, 1,5 mg/L, 24,5 mg/L y 49 mg/L, correspondientes a los valores de la CMI, 3 veces la CMI y las C_{max} medias estimadas en LCR con dosis de 200 mg/Kg/día y 400 mg/Kg/día, respectivamente. Como grupo control se inoculó un quinto tubo sin antibiótico.

En el caso del estudio de sinergia de ambos antibióticos, se inocularon 5×10^5 UFC/mL en 3 tubos con 20 mL de medio de cultivo Müller-Hinton en cada uno de los cuales se añadieron las siguientes concentraciones de antibióticos: 0,5 mg/L de ampicilina + 0,5 mg/L de moxifloxacino, 1,5 mg/L de ampicilina + 1,5 mg/L de moxifloxacino, y 49 mg/L de ampicilina + 2,28 mg/L de moxifloxacino, correspondientes a los valores de la CMI, 3 veces la

CMI y las C_{max} medias estimadas en LCR con dosis de 400 mg/Kg/día de ampicilina y 800 mg/día de moxifloxacino, respectivamente. Como grupo control se inoculó un cuarto tubo sin antibiótico.

Todos los tubos fueron incubados a 37°C en atmósfera aerobia.

A las 0, 3, 6, 24 y 48 horas de la inoculación, se realizaron diluciones seriadas (10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6}) de cada uno de los tubos con las diferentes concentraciones de antibióticos y del tubo control, para posteriormente subcultivar 10µL de cada una de ellas en placas de agar sangre. Las placas fueron incubadas a 37°C en atmósfera aerobia durante un período de 20 a 24 horas, pasado el cual se procedió al recuento de las colonias, expresándose los resultados en UFC/mL, correspondientes a la media +/- error estándar de los 3 experimentos.

La actividad bactericida fue definida como la muerte de al menos el 99,9% del inóculo inicial después de 24 horas de incubación (reducción de al menos 3 log UFC/mL).

La tasa de muerte fue definida como la disminución del inóculo inicial en las primeras 3 horas (61).

Los resultados de la interacción de los antimicrobianos estudiados en combinación mediante curvas de muerte bacteriana, fueron interpretados de acuerdo a los criterios establecidos por Pillai et al. (61, 64). Se consideró efecto sinérgico a una reducción de al menos 2 log en el recuento de colonias

a las 24 horas de la combinación de ambos antibióticos, respecto al recuento obtenido con el antimicrobiano más activo en solitario.

Adicionalmente se estudió la disminución del área bajo la curva de muerte bacteriana (AUKC) a las 6, 24 y 48 horas, en base a lo publicado por MacGowan et al. (64 bis, 65).

Las curvas de muerte fueron modelizadas y estudiadas mediante el programa GraphPadPrism 5.0 (©2014 GraphPad Software, Inc).

4.8 Actividad antimicrobiana intracelular

4.8.1 Aislamientos bacterianos y condiciones de crecimiento

Se utilizaron para los experimentos seis cepas de *L. monocytogenes* seleccionadas en base a lo indicado en el apartado 4.6. Las cepas se sembraron en caldo Müeller-Hinton y se incubaron a 37°C durante 20-24 horas. Posteriormente, los cultivos fueron lavados con solución tampón fosfato salino (PBS) y resuspendidos en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) antes de su uso en los experimentos en células eucariotas.

4.8.2 Cultivo e infección de las células humanas

Para el estudio de la actividad intracelular, se utilizó DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) inactivado por calor, vancomicina (50 µg/mL), gentamicina (20 µg/mL), anfotericina B (0,25 µg/mL) y tampón N-2-(hydroxyethyl) piperazine-N'-2-ethane sulfonicacid (HEPES) al 1%, e incubado a 37°C en estufa de CO₂. Las células A549 (línea celular Type II pneumocyte derivada de carcinoma de pulmón humano) fueron subcultivadas de forma rutinaria cada 3-4 días.

Se preparó una suspensión de 1 x 10⁵ células/mL, inoculándose 1 mL del medio con las células en cada uno de los pocillos de las placas de cultivo celular antes de su infección con *L. monocytogenes*. Se incubaron 24 horas hasta formar una monocapa confluyente uniforme. Inmediatamente antes de la infección con *L. monocytogenes*, las células A549 fueron lavadas tres veces con PBS precalentado y posteriormente incubadas en DMEM sin SBF ni antibióticos con 1 x 10⁸ UFC/mL de *L. monocytogenes*, durante 1 hora en estufa a 37°C.

4.8.3 Valoración de la actividad intracelular

Tras ese período, las células A549 infectadas se lavaron tres veces con PBS precalentado y fueron tratadas con gentamicina a una concentración de 256 µg/mL durante una hora en estufa a 37°C, a fin de eliminar las bacterias extracelulares. Posteriormente las células se lavaron tres veces con PBS

precalentado y fueron tratadas con 0,5 y 1 C_{\max} de moxifloxacino durante 1 y 24 horas y con 0,5 y 1 C_{\max} de ampicilina durante 1 y 24 horas.

Tras los tiempos indicados, las células fueron lisadas con Triton X-100 al 0.5% y posteriormente sembradas en placas de agar sangre realizándose diluciones seriadas (10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6}). Se incubaron a 37°C durante 24 horas para el recuento de colonias, y así determinar el número de bacterias intracelulares supervivientes.

Los resultados fueron modelizados y estudiados mediante el programa GraphPadPrism 5.0 (©2014 GraphPad Software, Inc).

RESULTADOS

5 Resultados

5.1 Actividad antimicrobiana extracelular. Microdilución en caldo

5.1.1 Determinación de la CMI y CMB

Las 150 cepas de *L. monocytogenes* estudiadas por el método de microdilución en caldo fueron sensibles a moxifloxacino y ampicilina, al utilizar los puntos de corte de $S \leq 0,5$ mg/L para moxifloxacino según el punto de corte determinado mediante la simulación de Monte Carlo y $S \leq 1$ mg/L para ampicilina según criterios EUCAST.

Los valores modales $CMI_{50/90}$ para moxifloxacino correspondieron a 0,25/0,5 mg/L, respectivamente, comprendiendo un rango de 0,125 a 0,5 mg/L. El 83,3% de las cepas tenían un valor de CMI por debajo de 0,25 mg/L.

Los valores modales $CMB_{50/90}$ para moxifloxacino correspondieron a 0,5 mg/L para ambos valores, comprendiendo un rango de 0,125 a 0,5 mg/L.

Los valores modales $CMI_{50/90}$ para ampicilina fueron de 0,25/0,5 mg/L, respectivamente, comprendiendo un rango de 0,125 a 0,5 mg/L.

Los valores modales $CMB_{50/90}$ para ampicilina fueron ≥ 8 mg/L para ambos valores, comprendiendo un rango de 1 a ≥ 8 mg/L, siendo la $CMB \geq 8$ mg/L en el 86% de las cepas.

En la tabla 2 se muestra el rango de CMI y CMB de cada antibiótico, así como los percentiles 50 y 90, demostrándose la gran actividad bactericida de moxifloxacino, con un cociente CMB/CMI entre 0,25 y 4, en contraposición con ampicilina, con cociente CMB/CMI entre 2 y ≥ 64 , comportándose como bacteriostático.

Tabla 2. Valores modales de CMI y CMB para moxifloxacino y ampicilina.

		Moxifloxacino CMI	Moxifloxacino CMB	Ampicilina CMI	Ampicilina CMB
N	Válidos	150	150	150	150
	Perdidos	0	0	0	0
Rango		0,125	0,125	0,125	1
		0,5	0,5	0,5	≥ 8
Percentiles	50	0,25	0,5	0,25	≥ 8
	90	0,5	0,5	0,5	≥ 8

En la tabla 3 se presenta la totalidad de cepas estudiadas frente a moxifloxacino y ampicilina, el serotipo y pulsotipo de cada una de ellas, su pertenencia a algún clon epidémico, y los valores de CMI y CMB obtenidos para ambos antibióticos.

Tabla 3. Serotipo, pulsotipo, CMI y CMB de moxifloxacino y ampicilina de las cepas estudiadas.

ID cepa	Tipo	Serotipo	PFGE	Serotipo final	EC	Ampicilina CMI	Ampicilina CMB	Moxifloxacino CMI	Moxifloxacino CMB
2	4	4b	P28	4b		0,25	8	0,25	0,25
3	1	1/2b	P21	1/2b		0,25	4	0,125	0,125
4	4	4b	P28	4b		0,25	8	0,25	0,5
5	4	4b	P17	4b	ECI	0,5	8	0,5	0,5
6	4	4b	P31	4b		0,5	8	0,25	0,5
7	4	4b	P14	4b		0,5	4	0,25	0,25
8	1	1/2b	P22	1/2b		0,25	8	0,25	0,25
9	1	1/2b	P22	1/2b		0,25	8	0,125	0,25
10	4	4b	P19	4b	ECI	0,5	8	0,25	0,5
11	1	1/2b	P14	1/2b		0,25	8	0,125	0,25
12	4	4b	P37	4b	ECII	0,5	8	0,25	0,5
13	1	1/2a	P53	1/2a		0,25	8	0,25	0,5
14	4	4b	P30	4b		0,5	4	0,5	0,5
15	1	1/2a	P53	1/2a		0,25	8	0,5	0,5
16	1	1/2b	P13	1/2b		0,25	8	0,25	0,25
17	4	4b	P32	4b		0,5	8	0,25	0,25

18	4	4b	P19	4b	ECI	0,5	8	0,25	0,25
19	4	4b	P34	4b		0,5	8	0,25	0,25
20	4	4b	P35	4b		0,5	8	0,25	0,25
21	1	1/2b	P23	1/2b		0,5	8	0,25	0,25
22	4	4b	P19	4b	ECI	0,5	8	0,25	0,25
23	4	4b	P19	4b	ECI	0,5	8	0,25	0,25
24	4	4b	P19	4b	ECI	0,5	8	0,25	0,25
25	1	1/2a	P54	1/2a	ECIII	0,25	8	0,5	0,5
26	4	4b	P28	4b		0,5	8	0,25	0,5
27	4	4b	P28	4b		0,5	8	0,25	0,5
28	1	1/2b	P22	1/2b		0,25	8	0,5	0,5
29	4	4b	P31	4b		0,5	4	0,25	0,5
30	4	4b	P8	4b	ECI	0,5	8	0,25	0,5
31	1	1/2b	P22	1/2b		0,25	8	0,25	0,25
32	4	4b	P19	4b	ECI	0,5	8	0,25	0,5
33	4	4b	P7	4b	ECI	0,5	2	0,25	0,5
34	4	4b	P28	4b		0,5	8	0,25	0,5
35	4	4b	P20	4b	ECI	0,25	8	0,25	0,5
36	4	4b	P18	4b	ECI	0,5	8	0,25	0,5

37	4	4b	P36	4b		0,5	4	0,25	0,5
38	4	4b	P36	4b	ECII	0,25	8	0,25	0,5
39	4	4b	P5	4b		0,5	4	0,5	0,5
40	1	1/2a	P53	1/2a	ECIII	0,25	8	0,25	0,5
41	4	4b	P5	4b		0,5	8	0,25	0,5
42	4	4b	P9	4b	ECI	0,25	8	0,5	0,5
43	4	4b	P9	4b	ECI	0,25	8	0,25	0,5
44	4	4b	P19	4b	ECI	0,5	8	0,25	0,5
45	4	4b	P7	4b	ECI	0,25	4	0,25	0,5
46	4	4b	P10	4b		0,25	8	0,25	0,5
47	4	4b	P37	4b	ECII	0,5	8	0,25	0,25
48	4	4b	P11	4b	ECI	0,25	8	0,25	0,5
49	4	4b	P19	4b	ECI	0,5	8	0,5	0,5
50	1	1/2a	P53	1/2a		0,125	8	0,25	0,5
51	1	1/2a	P53	1/2a		0,125	4	0,25	0,5
52	4	4b	P47	4b	ECII	0,25	8	0,25	0,25
53	1	1/2b	P22	1/2b		0,25	8	0,125	0,25
54	1	1/2b	P52	1/2b		0,25	8	0,25	0,25
55	4	4b	P33	4b		0,5	8	0,25	0,25

56	4	4b	P5	4b	ECI	0,5	8	0,25	0,5
57	1	1/2a	P53	1/2a		0,25	8	0,5	0,5
58	1	1/2b	P2	1/2b		0,5	4	0,25	0,25
59	1	1/2a	P53	1/2a		0,125	8	0,5	0,5
60	1	1/2a	P53	1/2a	ECIII	0,5	8	0,5	0,5
61	1	1/2a	P53	1/2a		0,5	8	0,5	0,25
62	1	1/2a	P15	1/2a		0,125	8	0,5	0,5
63	1	1/2a	P41	1/2a		0,25	8	0,5	0,5
64	1	1/2b	P14	1/2b		0,25	8	0,25	0,25
65	4	4b	P45	4b	ECII	0,25	8	0,25	0,25
66	1	1/2a	P58	1/2a		0,25	8	0,25	0,25
67	4	4b	P44	4b	ECI	0,25	8	0,25	0,25
68	1	1/2b	P57	1/2b		0,25	8	0,25	0,5
69	1	1/2a	P55	1/2a		0,25	8	0,25	0,5
70	4	4b	P38	4b	ECII	0,25	8	0,25	0,5
71	4	4b	P38	4b	ECII	0,5	8	0,5	0,5
72	4	4b	P43	4b		0,5	4	0,25	0,25
73	4	4b	P44	4b	ECI	0,25	8	0,25	0,5
74	4	4b	P9	4b	ECI	0,5	8	0,25	0,5

75	1	1/2a	P53	1/2a	ECIII	0,25	8	0,25	0,5
76	1	1/2b	P42	1/2b		0,25	8	0,25	0,5
77	1	1/2b	P51	1/2b		0,25	8	0,25	0,5
78	4	4b	P9	4b	ECI	0,5	8	0,25	0,5
79	4	4b	P44	4b	ECII	0,25	8	0,5	0,5
80	1	1/2a	P53	1/2a	ECIII	0,125	8	0,25	0,25
81	1	1/2a	P53	1/2a	ECIII	0,125	8	0,25	0,5
82	1	1/2b	P48	1/2b		0,25	8	0,25	0,5
83	1	1/2a	P61	1/2a	ECIII	0,125	8	0,25	0,5
84	1	1/2b	P49	1/2b		0,125	8	0,25	0,5
85	1	1/2b	P42	1/2b		0,125	8	0,25	0,25
86	1	1/2c	P56	1/2c		0,25	8	0,25	0,25
87	4	4b	P9	4b	ECI	0,25	8	0,25	0,25
88	1	1/2a	P53	1/2a	ECIII	0,125	8	0,25	0,5
89	4	4b	P37	4b	ECII	0,25	8	0,5	0,5
90	4	4b	P9	4b	ECI	0,25	8	0,5	0,5
91	4	4b	P61	4b	ECI	0,125	8	0,25	0,5
92	1	1/2a	P24	1/2a	ECIII	0,125	8	0,5	0,5
93	4	4b	P26	4b		0,5	1	0,5	0,5

94	1	4b	P9	4b	ECI	0,25	8	0,25	0,5
95	1	1/2b	P6	1/2b		0,25	8	0,25	0,25
96	4	4b	P25	4b		0,25	8	0,25	0,5
97	4	4b	P7	4b		0,25	8	0,25	0,25
98	4	4b	P14	4b		0,25	8	0,25	0,5
99	1	1/2a	P59	1/2a		0,25	8	0,25	0,5
100	4	4b	P18	4b	ECI	0,25	4	0,25	0,5
101	4	4b	P28	4b	ECI	0,25	8	0,25	0,5
102	1	1/2b	P22	1/2b		0,25	8	0,25	0,25
103	4	4b	P9	4b	ECI	0,5	8	0,25	0,5
104	4	4b	P9	4b	ECI	0,5	8	0,5	0,5
105	1	1/2b	P1	1/2b		0,25	8	0,5	0,5
106	4	4b	P9	4b	ECI	0,25	8	0,5	0,5
107	4	4b	P28	4b		0,25	8	0,25	0,5
108	4	4b	P5	4b		0,125	8	0,5	0,5
109	1	1/2b	P3	1/2b		0,125	8	0,25	0,25
110	4	4b	P38	4b		0,25	4	0,25	0,5
111	4	4b	P7	4b	ECI	0,25	8	0,25	0,5
112	4	4b	P9	4b	ECI	0,25	8	0,25	0,5

113	1	1/2c	P56	1/2c		0,125	8	0,25	0,5
114	4	4b	P9	4b	ECI	0,25	8	0,25	0,5
115	1	1/2b	P13	1/2b		0,25	8	0,25	0,25
116	4	4b	P7	4b	ECI	0,25	8	0,25	0,5
117	1	1/2b	P16	1/2b		0,5	8	0,25	0,25
118	1	1/2c	P56	1/2c		0,25	4	0,5	0,5
119	4	4b	P12	4b	ECI	0,25	8	0,25	0,5
120	4	4b	P30	4b		0,25	8	0,25	0,5
121	4	4b	P9	4b	ECI	0,25	8	0,25	0,5
122	4	4b	P9	4b	ECI	0,25	8	0,5	0,5
123	1	1/2b	P48	1/2b		0,25	8	0,5	0,5
124	1	1/2a	P53	1/2a		0,25	8	0,5	0,5
125	1	1/2b	P1	1/2b		0,5	8	0,25	0,25
126	4	4b	P9	4b	ECI	0,25	8	0,5	0,5
127	4	4b	P9	4b		0,25	8	0,25	0,25
128	4	4b	P8	4b		0,25	8	0,25	0,5
129	4	4b	P9	4b		0,25	8	0,25	0,5
130	1	1/2b	P6	1/2b		0,25	4	0,25	0,25
131	4	4b	P19	4b	ECI	0,5	8	0,25	0,25

132	4	4b	P39	4b		0,25	8	0,25	0,5
133	1	1/2a	P60	1/2a		0,125	4	0,25	0,5
134	4	4b	P40	4b		0,25	8	0,5	0,5
135	1	1/2a	P53	1/2a		0,25	8	0,5	0,5
136	4	4b	P46	4b	ECII	0,5	4	0,25	0,25
137	4	4b	P4	4b		0,5	4	0,25	0,5
138	1	1/2b	P50	1/2b		0,25	8	0,25	0,5
139	1	1/2c	P56	1/2c		0,25	8	0,25	0,5
140	1	1/2b	P42	1/2b		0,25	4	0,25	0,25
141	1	1/2b	P42	1/2b		0,25	8	0,25	0,25
142	4	4b	P9	4b		0,5	8	0,25	0,5
143	4	4b	P25	4b		0,5	8	0,25	0,25
144	4	4b	P19	4b		0,5	8	0,25	0,25
145	4	4b	P7	4b	ECI	0,5	8	0,25	0,5
146	4	4b	P9	4b	ECI	0,25	8	0,25	0,5
147	4	4b	P9	4b	ECI	0,25	8	0,25	0,25
148	4	4b	P9	4b		0,25	8	0,25	0,5
149	4	4b	P9	4b		0,5	8	0,25	0,5
150	1	1/2a	P62	1/2a		0,25	4	0,25	0,5

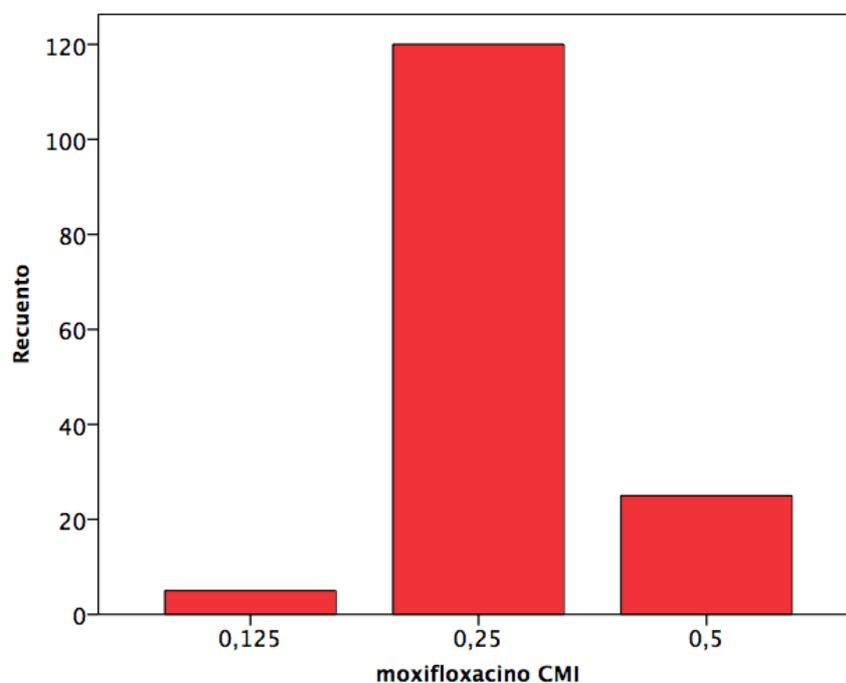
151	4	4b	P9	4b		0,5	8	0,25	0,5
-----	---	----	----	----	--	-----	---	------	-----

*PFGE: electroforesis en campo pulsado.

*EC: clon epidémico.

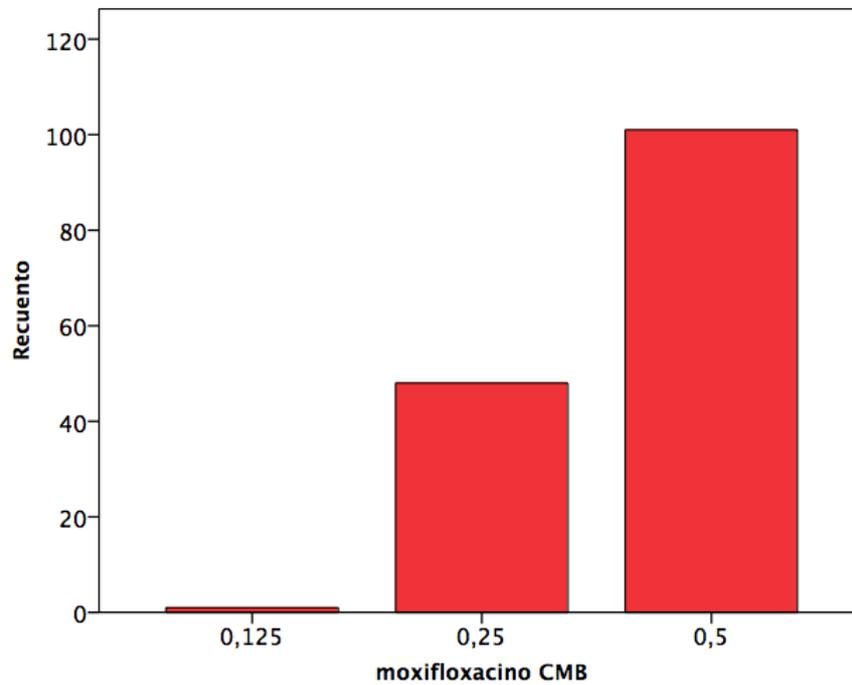
En las figuras 1 a la 4 se representan gráficamente los resultados de CMI y CMB a moxifloxacino y ampicilina en todas las cepas estudiadas.

Figura 1. Histograma de la distribución de valores de CMI de moxifloxacino en las 150 cepas.



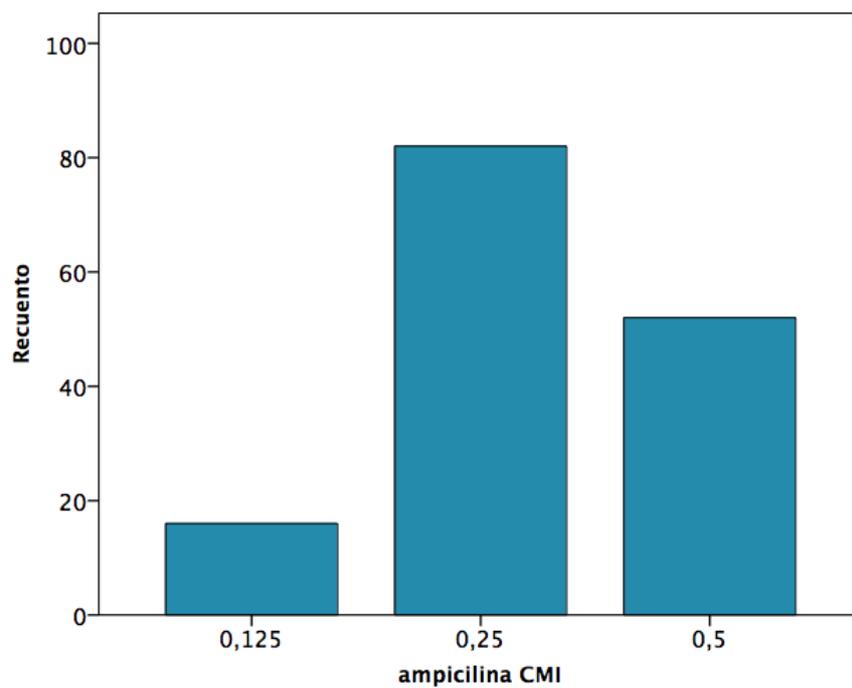
La mayor parte de las cepas (80%) eran sensibles a 0,25 mg/L de moxifloxacino. De las cepas restantes, el 16,7% lo fueron a 0,5 mg/L y el 3,3% a 0,125 mg/L.

Figura 2. Histograma de la distribución de valores de CMB de moxifloxacino en las 150 cepas.



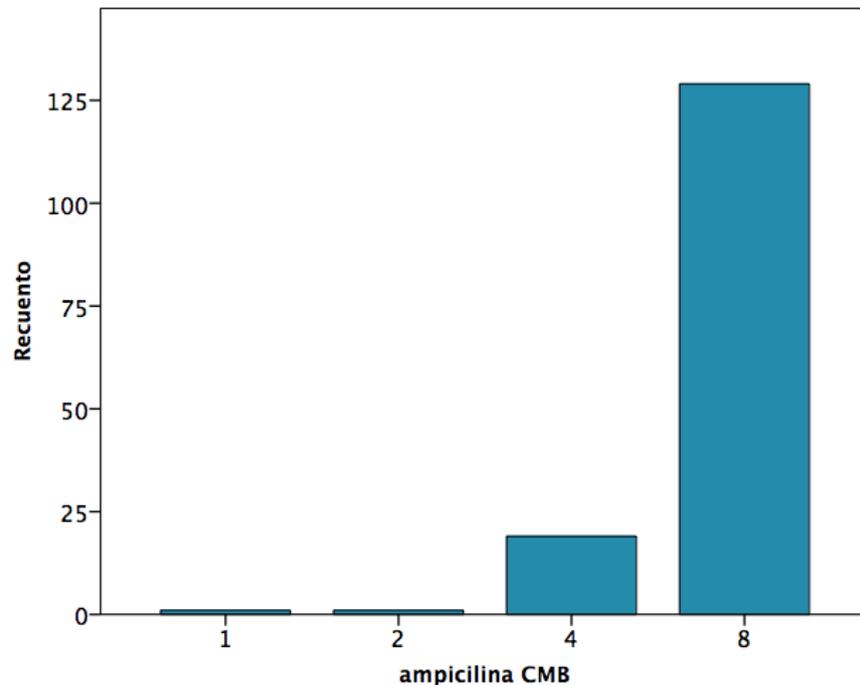
La mayoría de las cepas (67,3%) tuvieron una CMB de 0,5 mg/L. El 32% tuvo una CMB de 0,25 mg/L y el 0,7% de 0,125 mg/L.

Figura 3. Histograma de la distribución de valores de CMI de ampicilina en las 150 cepas.



Los porcentajes de sensibilidad a ampicilina fueron de 10,7%, 54,7% y 34,7% para las CMI de 0,125, 0,25 y 0,5 mg/L, respectivamente.

Figura 4. Histograma de la distribución de valores de CMB de ampicilina en las 150 cepas.



La mayor parte de las cepas (86%) presentaron una CMB ≥ 8 mg/L, en las restantes (12,7%), fue de 4mg/L. Sólo el 0,7% de las cepas tuvieron una CMB de 1 mg/L o de 2 mg/L.

5.1.2 Estudio de la CMI y CMB por serotipos

5.1.2.1 Moxifloxacino

En la tabla 4 se exponen los resultados de CMI de moxifloxacino en relación a los serotipos. Todos los serotipos estudiados se comportan de

forma similar, no obstante, la CMI₉₀ del serotipo 1/2b fue de 0,25 mg/L, difiriendo en una dilución al cómputo global. Las 6 cepas con las CMI de moxifloxacino más bajas (0,125 mg/L) correspondían al serogrupo 1/2b.

Tabla 4. Distribución de los valores de CMI de moxifloxacino en relación con los serotipos.

			Moxifloxacino CMI			Total
			0,125	0,25	0,5	
Serotipo	1/2a	Recuento	0	16	9	25
		% dentro de serotipo	0,0%	64,0%	36,0%	100,0%
	1/2b	Recuento	5	23	2	30
		% dentro de serotipo	16,7%	76,7%	6,7%	100,0%
	1/2c	Recuento	0	3	0	3
		% dentro de serotipo	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%
	4b	Recuento	0	78	14	92
		% dentro de serotipo	0,0%	84,8%	15,2%	100,0%

Serotipo 1/2a, CMI₅₀= 0,25 mg/L; CMI₉₀= 0,5 mg/L

Serotipo 1/2b, CMI₅₀= 0,25 mg/L; CMI₉₀= 0,25 mg/L

Serotipo 4b, CMI₅₀= 0,25 mg/L; CMI₉₀= 0,5 mg/L

En la tabla 5 se exponen los resultados de CMB a moxifloxacino en base al serotipo. La CMB₅₀ del serotipo 1/2b fue de 0,25 mg/L, difiriendo una dilución del cómputo global.

Tabla 5. Distribución de los valores de CMB de moxifloxacino en relación con los serotipos.

		Moxifloxacino CMB			Total	
		0,125	0,25	0,5		
Serotipo	1/2a	Recuento	0	3	22	25
		% dentro de serotipo	0,0%	12,0%	88,0%	100,0%
	1/2b	Recuento	1	21	8	30
		% dentro de serotipo	3,3%	70,0%	26,7%	100,0%
	1/2c	Recuento	0	1	2	3
		% dentro de serotipo	0,0%	33,3%	66,7%	100,0%
	4b	Recuento	0	23	69	92
		% dentro de serotipo	0,0%	25,0%	75,0%	100,0%

Serotipo 1/2a, CMB₅₀= 0,5 mg/L; CMB₉₀= 0,5 mg/L

Serotipo 1/2b, CMB₅₀= 0,25 mg/L; CMB₉₀= 0,5 mg/L

Serotipo 4b, CMB₅₀= 0,5 mg/L; CMB₉₀= 0,5 mg/L

5.1.2.2 Ampicilina

En la tabla 6 se exponen los resultados de CMI de ampicilina en relación al serotipo al que pertenecen las cepas. Como aspectos más destacables, los valores modales de CMI₅₀ y CMI₉₀ para los serotipos 1/2a y 1/2b fueron de 0,25 mg/L, mientras que en el serotipo 4b la CMI₉₀ aumentó en una dilución.

Tabla 6. Distribución de los valores de CMI de ampicilina en relación con los serotipos.

			Ampicilina CMI			Total
			0,125	0,25	0,5	
Serotipo	1/2a	Recuento	10	14	1	25
		% dentro de serotipo	40,0%	56,0%	4,0%	100,0%
	1/2b	Recuento	3	22	5	30
		% dentro de serotipo	10,0%	73,3%	16,7%	100,0%
	1/2c	Recuento	1	2	0	3
		% dentro de serotipo	33,3%	66,7%	0,0%	100,0%
	4b	Recuento	2	44	46	92
		% dentro de serotipo	2,2%	47,8%	50,0%	100,0%

Serotipo 1/2a, CMI₅₀= 0,25 mg/L; CMI₉₀= 0,25 mg/L

Serotipo 1/2b, CMI₅₀= 0,25 mg/L; CMI₉₀= 0,25 mg/L

Serotipo 4b, CMI₅₀= 0,25 mg/L; CMI₉₀= 0,5 mg/L

En la tabla 7 se exponen los resultados de CMB de ampicilina en relación al serotipo. No hubo diferencia de CMB entre los diferentes serotipos, coincidiendo tanto la CMB₅₀ como la CMB₉₀ (≥ 8 mg/L).

Tabla 7. Distribución de los valores de CMB de ampicilina en relación con los serotipos.

			Ampicilina CMB				Total
			1	2	4	≥ 8	
Serotipo	1/2a	Recuento	0	0	3	22	25
		% dentro de serotipo	0,0%	0,0%	12,0%	88,0%	100,0%
	1/2b	Recuento	0	0	4	26	30
		% dentro de serotipo	0,0%	0,0%	13,3%	86,7%	100,0%
	1/2c	Recuento	0	0	0	3	3
		% dentro de serotipo	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	100,0%
	4b	Recuento	1	1	12	78	92
		% dentro de serotipo	1,1%	1,1%	13,0%	84,8%	100,0%

Serotipo 1/2a, CMB₅₀= ≥ 8 mg/L; CMB₉₀= ≥ 8 mg/L

Serotipo 1/2b, CMB₅₀= ≥ 8 mg/L; CMB₉₀= ≥ 8 mg/L

Serotipo 4b, CMB₅₀= ≥ 8 mg/L; CMB₉₀= ≥ 8 mg/L

En base a los resultados obtenidos, podemos concluir que no existió diferencia significativa entre los diferentes serotipos de *Listeria* para ambos antibióticos.

5.1.3 Estudio de la CMI y CMB por clones epidémicos (EC) vs no epidémicos

5.1.3.1 Moxifloxacino

En la tabla 8 se exponen los resultados de CMI de moxifloxacino en relación al clon epidémico, no existiendo diferencias en los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ entre los distintos clones.

Tabla 8. Distribución de los valores de CMI de moxifloxacino en relación con los clones epidémicos.

			Moxifloxacino CMI			Total
			0,125	0,25	0,5	
EC	No EC	Recuento	5	69	14	88
		% dentro de EC	5,7%	78,4%	15,9%	100,0%
	EC I,II,III	Recuento	0	51	11	62
		% dentro de EC	0%	82,3%	17,7%	100,0%

	ECI	Recuento	0	36	7	43
		% dentro de EC	0,0%	83,7%	16,3%	100,0%
	ECH	Recuento	0	8	2	10
		% dentro de EC	0,0%	80,0%	20,0%	100,0%
	ECIII	Recuento	0	7	2	9
		% dentro de EC	0,0%	77,8%	22,2%	100,0%

No EC, CMI₅₀= 0,25 mg/L; CMI₉₀= 0,5 mg/L

ECI, II, III, CMI₅₀= 0,25 mg/L; CMI₉₀= 0,5 mg/L

ECI, CMI₅₀= 0,25 mg/L; CMI₉₀= 0,5 mg/L

ECH, CMI₅₀= 0,25 mg/L; CMI₉₀= 0,5 mg/L

ECIII, CMI₅₀= 0,25 mg/L; CMI₉₀= 0,5 mg/L

En la tabla 9 se exponen los resultados de CMB de moxifloxacino en relación al clon epidémico. Al igual que con los valores de CMI, no existieron diferencias entre los distintos clones.

Tabla 9. Distribución de los valores de CMB de moxifloxacino en relación con los clones epidémicos.

			Moxifloxacino CMB			Total
			0,125	0,25	0,5	
EC	No EC	Recuento	1	35	52	88
		% dentro de EC	1,1%	39,8%	59,1%	100,0%
	EC	Recuento	0	13	49	62

	I,II,III	% dentro de EC	0,0%	21,0%	79,0%	100,0%
	ECI	Recuento	0	8	35	43
		% dentro de EC	0,0%	18,6%	81,4%	100,0%
	ECII	Recuento	0	4	6	10
		% dentro de EC	0,0%	40,0%	60,0%	100,0%
	ECIII	Recuento	0	1	8	9
		% dentro de EC	0,0%	11,1%	88,9%	100,0%

No EC, CMB₅₀= 0,5 mg/L; CMB₉₀= 0,5 mg/L

ECI, II, III, CMB₅₀= 0,5 mg/L; CMB₉₀= 0,5 mg/L

ECI, CMB₅₀= 0,5 mg/L; CMB₉₀= 0,5 mg/L

ECII, CMB₅₀= 0,5 mg/L; CMB₉₀= 0,5 mg/L

ECIII, CMB₅₀= 0,5 mg/L; CMB₉₀= 0,5 mg/L

5.1.3.2 Ampicilina

En la tabla 10 se exponen los resultados de CMI de ampicilina en relación al clon epidémico.

Tabla 10. Distribución de los valores de CMI de ampicilina en relación con los clones epidémicos.

			Ampicilina CMI			Total
			0,125	0,25	0,5	
EC	No EC	Recuento	10	50	28	88

		% dentro de EC	11,4%	56,8%	31,8%	100,0%
	EC	Recuento	6	32	24	62
	I,II,III	% dentro de EC	9,7%	51,6%	38,7%	100%
	ECI	Recuento	1	23	19	43
		% dentro de EC	2,3%	53,5%	44,2%	100,0%
	ECII	Recuento	0	5	5	10
		% dentro de EC	0,0%	50,0%	50,0%	100,0%
	ECIII	Recuento	5	4	0	9
		% dentro de EC	55,6%	44,4%	0,0%	100,0%

No EC, CMI₅₀= 0,25 mg/L; CMI₉₀= 0,5 mg/L

ECI, II, III, CMI₅₀= 0,25 mg/L; CMI₉₀= 0,5 mg/L

ECI, CMI₅₀= 0,25 mg/L; CMI₉₀= 0,25 mg/L

ECII, CMI₅₀= 0,25 mg/L; CMI₉₀= 0,5 mg/L

ECIII, CMI₅₀= 0,125 mg/L; CMI₉₀= 0,25 mg/L

En la tabla 11 se exponen los resultados de CMB de ampicilina en relación al clon epidémico. No existieron diferencias de CMB entre los distintos clones.

Tabla 11. Distribución de los valores de CMB de ampicilina en relación con los clones epidémicos.

	Ampicilina CMB				Total
	1	2	4	≥8	

EC	No EC	Recuento	1	0	16	71	88
		% dentro de EC	1,1%	0,0%	18,2%	80,7%	100,0%
	EC	Recuento	0	1	3	58	62
		I,II,III	% dentro de EC	0,0%	1,7%	4,8%	93,5%
	ECI	Recuento	0	1	2	40	43
		% dentro de EC	0,0%	2,3%	4,7%	93,0%	100,0%
	ECII	Recuento	0	0	1	9	10
		% dentro de EC	0,0%	0,0%	10,0%	90,0%	100,0%
	ECIII	Recuento	0	0	0	9	9
		% dentro de EC	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	100,0%

No EC, CMB₅₀= ≥8 mg/L; CMB₉₀= ≥8 mg/L

ECI, II, III, CMB₅₀= ≥8 mg/L; CMB₉₀= ≥8 mg/L

ECI, CMB₅₀= ≥8 mg/L; CMB₉₀= ≥8 mg/L

ECII, CMB₅₀= ≥8 mg/L; CMB₉₀= ≥8 mg/L

ECIII, CMB₅₀= ≥8 mg/L; CMB₉₀= ≥8 mg/L

En base a los resultados obtenidos, podemos concluir que no existió diferencia significativa entre los diferentes clones epidémicos para ambos antibióticos.

5.1.4 Estudio de la CMI y CMB de los pulsotipos (PFGE) más importantes

5.1.4.1 Moxifloxacino

En la tabla 12 se exponen los resultados de CMI de moxifloxacino en relación con los dos pulsotipos más abundantes, P53 y P9, pertenecientes en su mayor parte a los clones ECIII y ECI, respectivamente. No existieron diferencias de CMI, salvo, la CMI₉₀ de P53 de 0,25 mg/L, una dilución menor que P9.

Tabla 12. Distribución de los valores de CMI de moxifloxacino en relación con los pulsotipos P53 y P9.

		Moxifloxacino CMI			Total
		0,125	0,25	0,5	
PFGE	P53	0	10	5	15
		0,0%	66,7%	33,3%	100,0%
	P9	0	17	6	23
		0,0%	73,9%	26,1%	100,0%

P53, CMI₅₀= 0,25 mg/L; CMI₉₀= 0,25 mg/L

P9, CMI₅₀= 0,25 mg/L; CMI₉₀= 0,5 mg/L

En la tabla 13 se exponen los resultados de CMB de moxifloxacino en relación con los dos pulsotipos más abundantes. No existieron diferencias.

Tabla 13. Distribución de los valores de CMB de moxifloxacino en relación con los pulsotipos P53 y P9.

		Moxifloxacino CMB			Total
		0,125	0,25	0,5	
PFGE	P53	0	2	13	15
		0,0%	13,3%	86,7%	100,0%
	P9	0	3	20	23
		0,0%	13,0%	87,0%	100,0%

P53, CMB₅₀= 0,5 mg/L; CMB₉₀= 0,5 mg/L

P9, CMB₅₀= 0,5 mg/L; CMB₉₀= 0,5 mg/L

5.1.4.2 Ampicilina

En la tabla 14 se exponen los resultados de CMI de ampicilina en los dos pulsotipos más abundantes. La CMI₉₀ de P53 fue de 0,25 mg/L, una dilución menor que P9.

Tabla 14. Distribución de los valores de CMI de ampicilina en relación con los pulsotipos P53 y P9.

		Ampicilina CMI			Total
		0,125	0,25	0,5	
PFGE	P53	6	8	1	15
		40,0%	53,3%	6,7%	100,0%

	P9	0	16	7	23
		0,0%	69,6%	30,4%	100,0%

P53, CMI₅₀= 0,25 mg/L; CMI₉₀= 0,25 mg/L

P9, CMI₅₀= 0,25 mg/L; CMI₉₀= 0,5 mg/L

En la tabla 15 se exponen los resultados de CMB de ampicilina en los dos clones más abundantes. No existieron diferencias.

Tabla 15. Distribución de los valores de CMB de ampicilina en relación con los pulsotipos P53 y P9.

		Ampicilina CMB				Total
		1	2	4	≥8	
PFGE	P53	0	0	1	14	15
		0,0%	0,0%	6,7%	93,3%	100,0%
	P9	0	0	0	23	23
		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	100,0%

P53, CMB₅₀= ≥8 mg/L; CMB₉₀= ≥8 mg/L

P9, CMB₅₀= ≥8 mg/L; CMB₉₀= ≥8 mg/L

En base a los resultados obtenidos, podemos concluir que no existió diferencia significativa entre los pulsotipos más importantes de *Listeria* (P53 y P9) para ambos antibióticos.

5.2 Estudio PK/PD

5.2.1 Cálculo de la C_{max} de moxifloxacinó en LCR por simulación de Monte Carlo

La C_{max} media de moxifloxacinó en LCR alcanzada en la simulación con dosis de 400 mg/día fue de 1,14 mg/L; variando en un rango comprendido entre 0,69-1,71 mg/L (Figura 5), mientras que con dosis de 800 mg/día fue de 2,28 mg/L; con un rango de 1,68-3,59 mg/L (Figura 6).

Figura 5. Distribución de la C_{max} de moxifloxacinó en LCR a dosis de 400 mg/día i.v.

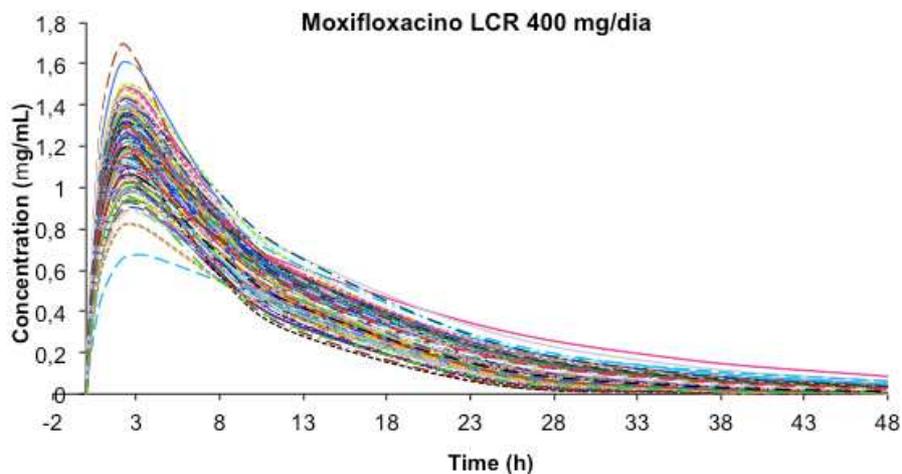
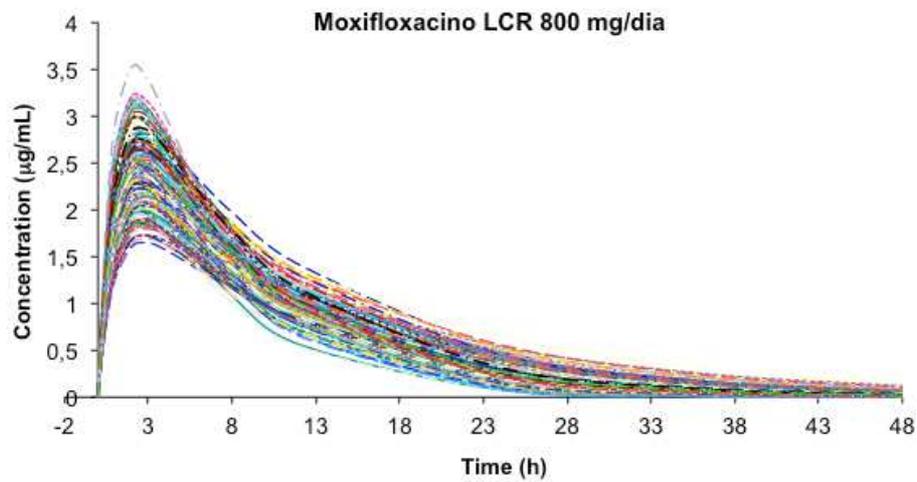


Figura 6. Distribución de la C_{max} de moxifloxacino en LCR a dosis de 800 mg/día i.v.



5.2.2 Cálculo de la C_{max} de ampicilina en LCR por simulación de Monte Carlo

La C_{max} media de ampicilina en LCR alcanzada en la simulación con dosis de 200 mg/Kg/día fue de 24,5 mg/L; variando en un rango comprendido entre 22,4-52,5 mg/L (Figura 7), mientras que con la dosis de 400 mg/Kg/día fue de 49 mg/L; con un rango entre 45,3-101,1 mg/L (Figura 8).

Figura 7. Distribución de la C_{max} de ampicilina en LCR a dosis de 200 mg/Kg/día i.v.

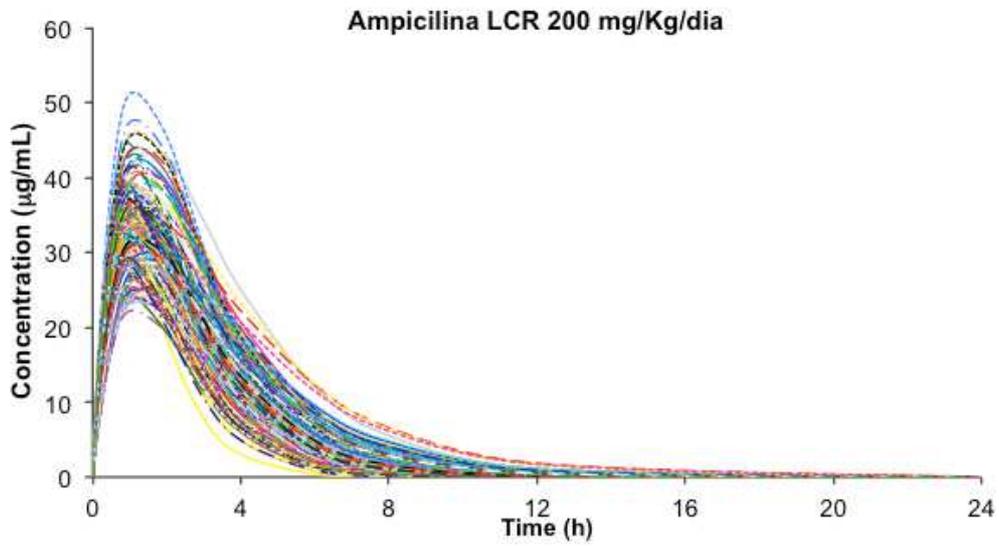
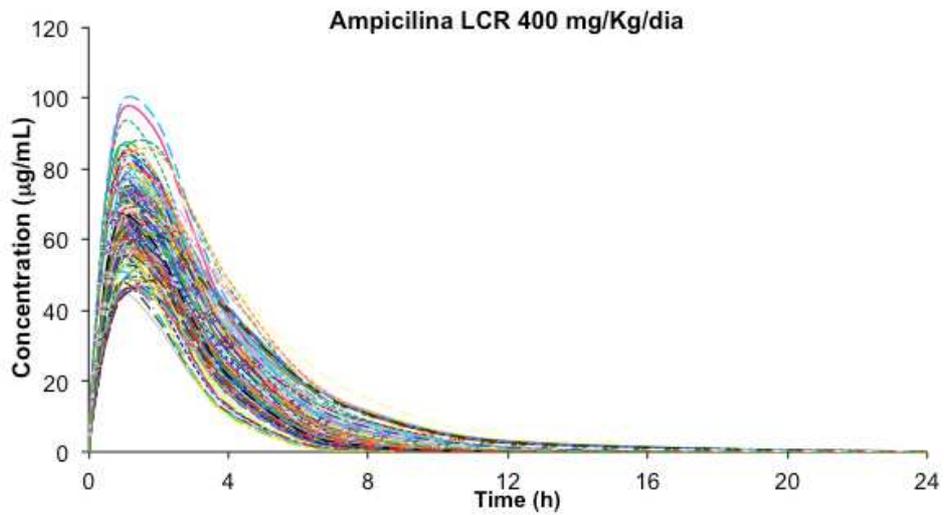


Figura 8. Distribución de la C_{max} de ampicilina en LCR a dosis de 400 mg/Kg/día i.v.



5.2.3 Análisis PK/PD de la actividad de moxifloxacino en SNC

5.2.3.1 Dosis de 400 mg/día

La probabilidad (%) de alcanzar un $AUC_{\text{libre},24h}/CMI = 35$ con dosis de 400 mg/c24h i.v. en LCR por simulación Monte Carlo fue del 85% (Figura 9).

El modelo predice una buena actividad de moxifloxacino hasta valores de $CMI = 0,25$ mg/L (99%; 9900/10000 de las simulaciones) y una caída de actividad a valores de $\geq 0,5$ mg/L (32,5%; 3249/10000 de las simulaciones).

Figura 9. Probabilidad de alcanzar el objetivo AUC/MIC a dosis de 400 mg/día i.v. de moxifloxacino.

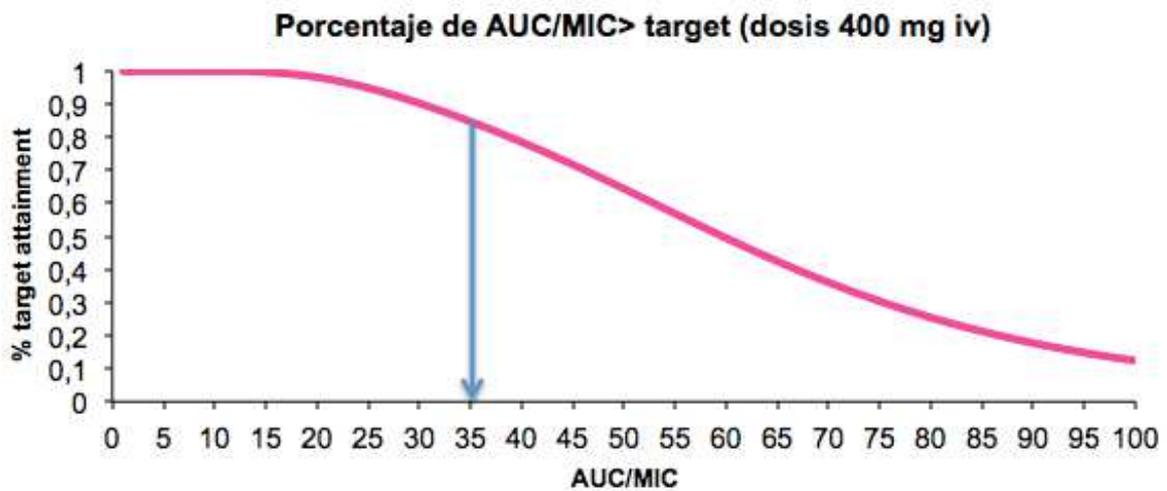


Tabla 16. Probabilidad de alcanzar el objetivo AUC/MIC a dosis de 400 mg/día i.v. de moxifloxacino en función de la CMI.

Dosis 400 mg/Kg/dia Target	CMI %CMI %Target	0,016 0%	0,032 0%	0,064 0%	0,125 6%	0,25 73%	0,5 21%	1 0%	2 0%	4 0%
1	100%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000
5	100%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	9640	1591
10	100%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	9640	1591	3
15	100%	10000	10000	10000	10000	10000	9978	5653	40	0
20	99%	10000	10000	10000	10000	10000	9640	1591	3	0
25	96%	10000	10000	10000	10000	9995	8152	298	0	0
30	91%	10000	10000	10000	10000	9978	5653	40	0	0
35	85%	10000	10000	10000	10000	9900	3249	4	0	0
40	80%	10000	10000	10000	10000	9640	1591	3	0	0
45	74%	10000	10000	10000	9999	9079	730	0	0	0

5.2.3.2 Dosis de 800 mg/día

La probabilidad (%) de alcanzar un $AUC_{\text{libre},24h}/CMI = 35$ con dosis de 800 mg/c24h i.v. en LCR por simulación Monte Carlo fue de 99,2% (Figura 10).

El modelo predice una buena actividad de moxifloxacino hasta valores de $CMI = 0,5$ mg/L (95,7%; 9573/10000 de las simulaciones) y una caída de actividad a valores de ≥ 1 mg/L (40,8%; 4080/10000 de las simulaciones).

Figura 10. Probabilidad de alcanzar el objetivo AUC/MIC a dosis de 800 mg/día i.v. de moxifloxacino.

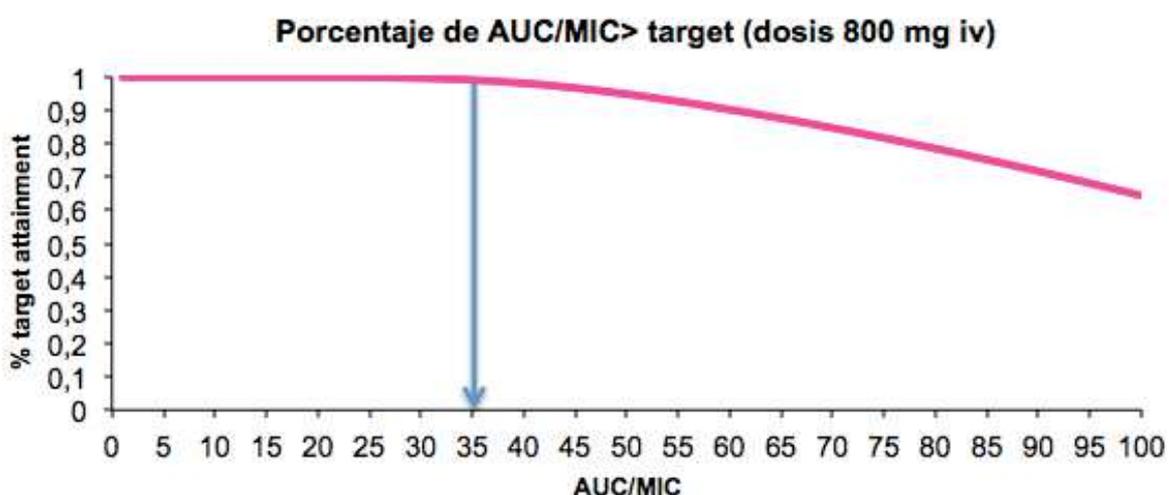


Tabla 17. Probabilidad de alcanzar el objetivo AUC/MIC a dosis de 800 mg/día i.v. de moxifloxacino en función de la CMI.

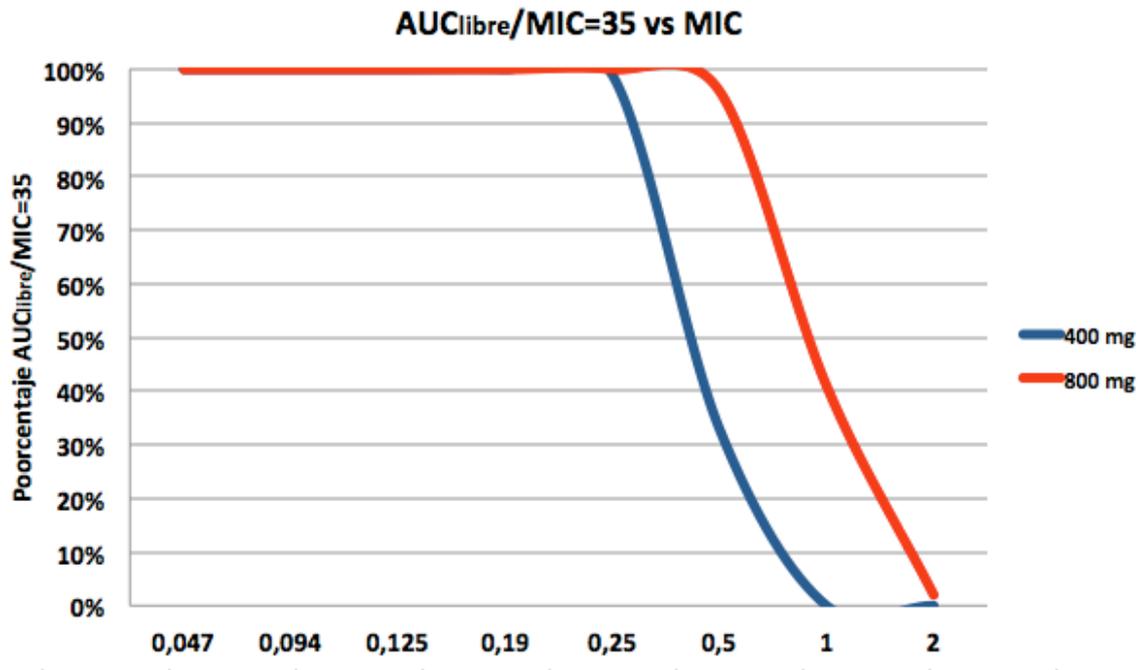
Dosis 800 mg/Kg/día Target	CMI %CMI %Target	0,016 0%	0,032 0%	0,064 0%	0,125 6%	0,25 73%	0,5 21%	1 0%	2 0%	4 0%
1	100%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000
5	100%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	9997	9150
10	100%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	9997	9150	2704
15	100%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	9837	5855	386
20	100%	10000	10000	10000	10000	10000	9997	9150	2704	52
25	100%	10000	10000	10000	10000	10000	9961	7726	1068	9
30	100%	10000	10000	10000	10000	10000	9837	5855	386	3
35	99%	10000	10000	10000	10000	9998	9573	4080	145	1
40	98%	10000	10000	10000	10000	9997	9150	2704	52	0
45	97%	10000	10000	10000	10000	9985	8541	1710	16	0

5.2.4 Punto de corte PK/PD para moxifloxacino

Los resultados previos nos permiten establecer como punto de corte PK/PD para la dosis de 400 mg/día de moxifloxacino a nivel de SNC en $\leq 0,25$ mg/L y para la dosis de 800 mg/día de $\leq 0,5$ mg/L.

Considerando estos puntos de corte, a dosis de 400 mg/día, el 73% de las cepas serían sensibles y a dosis de 800 mg/día, el 100% de las cepas.

Figura 11. Cálculo del punto de corte PK/PD de moxifloxacinó en LCR en función de la dosis.



5.2.5 Análisis PK/PD de la actividad de ampicilina en sistema nervioso central (SNC)

5.2.5.1 Dosis de 200 mg/Kg/día

El análisis demuestra que con esta dosis y a nivel del SNC, el objetivo terapéutico de $C_{max}/CMB \geq 10$ sólo se conseguiría en el 4% de las

simulaciones. Además, el modelo predice una buena actividad de ampicilina hasta valores de CMB = 2 mg/L (99,7%; 9970/10000 de las simulaciones) y una caída brusca de actividad a valores de ≥ 4 mg/L (12%; 1205/10000 de las simulaciones).

Figura 12. Probabilidad de alcanzar el objetivo Cmax/CMB a dosis de 200 mg/Kg/día i.v. de ampicilina.

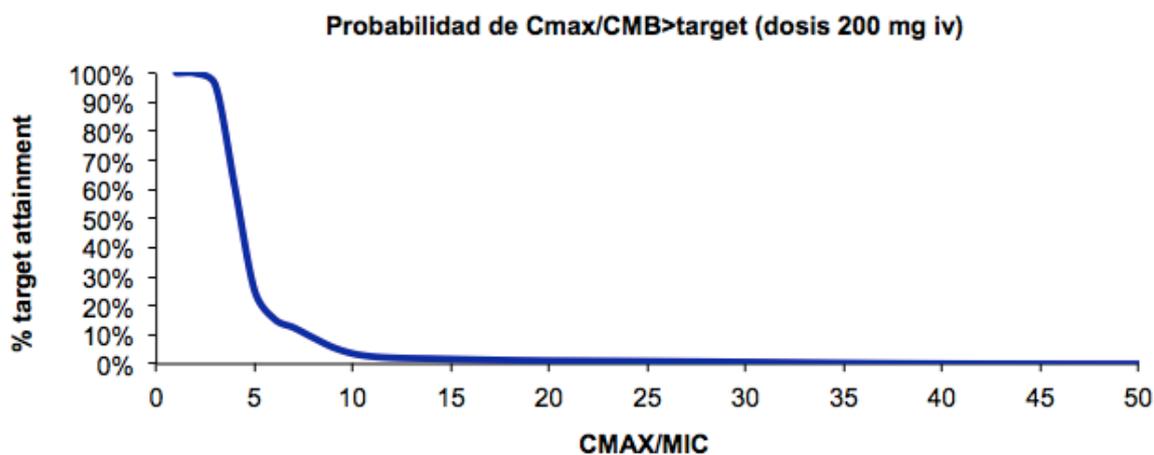


Tabla 18. Probabilidad de alcanzar el objetivo Cmax/CMB a dosis de 200 mg/Kg/día i.v. de ampicilina en función de la CMI.

Dosis 200 mg/Kg/día Target	CMB %CMB %Target	0,38 0%	0,5 0%	0,125 0%	0,25 0%	0,5 0%	1 1%	2 1%	4 13%	8 85%
1	100%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000
2	100%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000
3	96%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	9529
4	61%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	5365
5	25%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	9970	1205
6	15%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	9529	129
7	12%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	7989	10
8	9%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	5365	0
9	6%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	9998	2838	0
10	4%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	9970	1205	0
11	3%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	9854	428	0
12	2%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	9529	129	0

5.2.5.2 Dosis de 400 mg/Kg/día

El análisis demuestra que con esta dosis y a nivel del SNC, el objetivo terapéutico de $C_{\max, \text{ libre}}/\text{CMB} \geq 10$ sólo se conseguiría en el 25% de las simulaciones. Además, el modelo predice una buena actividad de ampicilina hasta valores de $\text{CMB} = 4 \text{ mg/L}$ (99,7%; 9976/10000 de las simulaciones) y una caída brusca de actividad a valores de $\geq 8 \text{ mg/L}$ (12,2%; 1223/10000 de las simulaciones). Por lo tanto, aunque con el aumento de la dosis a 400 mg/día se mejoran los resultados, de un 4% a un 25% estos distan mucho de la situación óptima $\geq 90\%$.

Figura 13. Probabilidad de alcanzar el objetivo C_{\max}/CMB a dosis de 400 mg/Kg/día i.v. de ampicilina.

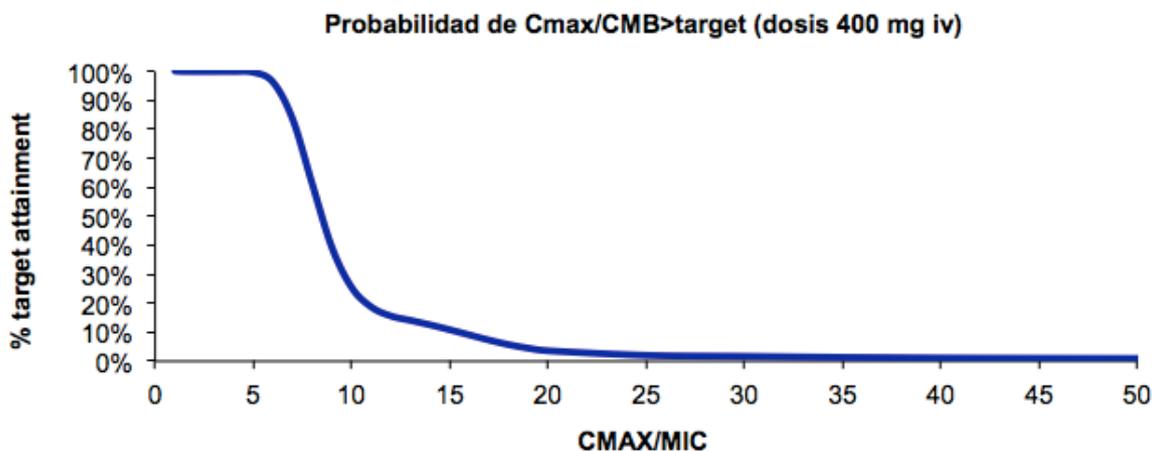


Tabla 19. Probabilidad de alcanzar el objetivo Cmax/CMB a dosis de 400 mg/Kg/día i.v. de ampicilina en función de la CMI.

Dosis 400 mg/Kg/día Target	CMB %CMB %Target	0,38 0%	0,5 0%	0,125 0%	0,25 0%	0,5 0%	1 1%	2 1%	4 13%	8 85%
1	100%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000
2	100%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000
3	100%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000
4	100%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	9999
5	100%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	9976
6	97%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	9614
7	84%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	8104
8	61%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	9999	5441
9	40%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	9996	2910
10	25%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	9976	1223
11	18%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	9896	427
12	16%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	9614	141

5.3 Actividad antimicrobiana extracelular. Curvas de tiempo-muerte

5.3.1 Cepas incluidas en el estudio

En función de los datos obtenidos en la simulación de Monte Carlo se incluyeron las siguientes cepas representativas para el estudio de la actividad extracelular (tabla 20).

Tabla 20. Cepas representativas de las 150 cepas estudiadas.

Nº de cepa	serotipo	Nº de cepa	EC	CMI ampicilina	CMI moxifloxacino
79	4b	49	ECII	0,25	0,5
60	1/2a	60	ECIII	0,5	0,5
28	1/2b	28	-	0,125	0,5
118	1/2c	118	-	0,25	0,5
57	1/2a	57	-	0,25	0,5
49	4b	49	ECI	0,5	0,5

*EC: clon epidémico.

5.3.2 Actividad extracelular de moxifloxacin

En las tablas siguientes se incluye el recuento bacteriano (tabla 21) y logarítmico (tabla 22) inicial y a las diferentes horas de las seis cepas, tanto en el grupo control como a las diferentes concentraciones de moxifloxacin.

Tabla 21. Recuento bacteriano de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacin.

Cepa ID 60	CONTROL		0,5 mg/L		1,5 mg/L		2,28 mg/L	
0h	1768000	100000	1768000	100000	1768000	100000	1768000	100000
1h	4420000	1000000	1280000	1100000	1360000	1300000	1032000	400000
3h	8700000	3500000	488000	700000	105000	100000	73000	44000
6h	120000000	21200000	55280	104000	1730	5200	730	1840
24h	630000000	140000000	1700	4000	70	40	40	30
48h	460000000	70000000	20	200	10	10	0	0
Cepa ID 28	CONTROL		0,5 mg/L		1,5 mg/L		2,28 mg/L	
0h	788000	1040000	1040000	788000	1040000	788000	1040000	788000
1h	1108000	1476000	1456000	828000	824000	376000	664000	168000
3h	22400000	10600000	16160	112000	3160	1280	2160	770
6h	19600000	104000000	470	800	50	10	90	130
24h	100000000	420000000	30	0	0	0	0	0
48h	150000000	550000000	0	10	0	0	0	0
Cepa ID 79	CONTROL		0,5 mg/L		1,5 mg/L		2,28 mg/L	
0h	840000	1232000	1232000	840000	1232000	840000	1232000	840000
1h	1400000	1408000	1192000	792000	1112000	804000	984000	808000
3h	3200000	10800000	344000	828000	72000	156000	39000	84000
6h	14400000	129600000	10800	35000	910	2680	400	1640
24h	110000000	590000000	90	120	10	20	0	10
48h	130000000	550000000	0	30	20	20	0	0
Cepa ID 118	CONTROL		0,5 mg/L		1,5 mg/L		2,28 mg/L	
0h	324000	464000	464000	324000	464000	324000	464000	324000
1h	2800000	498000	452000	2700000	452000	752000	408000	616000
3h	18000000	1900000	260000	156000	4640	1600	2120	910
6h	250000000	34800000	2480	4360	220	150	40	40
24h	470000000	101200000	90	100	20	10	0	0
48h	480000000	105600000	40	50	0	10	0	0
Cepa ID 49	CONTROL		0,5 mg/L		1,5 mg/L		2,28 mg/L	
0h	4100000	1184000	1184000	4100000	1184000	4100000	1184000	4100000
1h	2600000	1696000	1016000	2800000	936000	2000000	496000	2100000
3h	780000	18400000	53000	624000	2320	756000	1840	544000
6h	4300000	167200000	990	160000	100	148000	90	108000
24h	630000000	400000000	60	270	20	170	0	170
48h	600000000	146400000	10	50	10	50	0	0
Cepa ID 57	CONTROL		0,5 mg/L		1,5 mg/L		2,28 mg/L	
0h	2700000	848000	848000	2700000	848000	2700000	848000	2700000
1h	1300000	1860000	912000	2400000	884000	1300000	888000	2300000
3h	1100000	3800000	748000	900000	79000	1600000	24000	1200000
6h	564000	57600000	43000	196000	1600	184000	650	244000
24h	750000000	131600000	2920	770	130	1160	10	560
48h	760000000	129600000	480	50	10	40	10	0

Tabla 22. Recuento logarítmico de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacino.

Cepa ID 60	CONTROL		0,5 mg/L		1,5 mg/L		2,28 mg/L	
0h	6,2	5,0	6,2	5,0	6,2	5,0	6,2	5,0
1h	6,6	6,0	6,1	6,0	6,1	6,1	6,0	5,6
3h	6,9	6,5	5,7	5,8	5,0	5,0	4,9	4,6
6h	8,1	7,3	4,7	5,0	3,2	3,7	2,9	3,3
24h	8,8	8,1	3,2	3,6	1,8	1,6	1,6	1,5
48h	8,7	7,8	1,3	2,3	1,0	1,0	0,0	0,0
Cepa ID 28	CONTROL		0,5 mg/L		1,5 mg/L		2,28 mg/L	
0h	5,9	6,0	6,0	5,9	6,0	5,9	6,0	5,9
1h	6,0	6,2	6,2	5,9	5,9	5,6	5,8	5,2
3h	7,4	7,0	4,2	5,0	3,5	3,1	3,3	2,9
6h	7,3	8,0	2,7	2,9	1,7	1,0	2,0	2,1
24h	8,0	8,6	1,5	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0
48h	8,2	8,7	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cepa ID 79	CONTROL		0,5 mg/L		1,5 mg/L		2,28 mg/L	
0h	5,9	6,1	6,1	5,9	6,1	5,9	6,1	5,9
1h	6,1	6,1	6,1	5,9	6,0	5,9	6,0	5,9
3h	6,5	7,0	5,5	5,9	4,9	5,2	4,6	4,9
6h	7,2	8,1	4,0	4,5	3,0	3,4	2,6	3,2
24h	8,0	8,8	2,0	2,1	1,0	1,3	0,0	1,0
48h	8,1	8,7	1,3	1,8	0,0	1,3	0,0	0,0
Cepa ID 118	CONTROL		0,5 mg/L		1,5 mg/L		2,28 mg/L	
0h	5,5	5,7	5,7	5,5	5,7	5,5	5,7	5,5
1h	6,4	5,7	5,7	6,4	5,7	5,9	5,6	5,8
3h	7,3	6,3	5,4	5,2	3,7	3,2	3,3	3,0
6h	8,4	7,5	3,4	3,6	2,3	2,2	1,6	1,6
24h	8,7	8,0	2,0	2,0	1,3	1,0	0,0	0,0
48h	8,7	8,0	1,6	1,7	0,0	1,0	0,0	0,0
Cepa ID 49	CONTROL		0,5 mg/L		1,5 mg/L		2,28 mg/L	
0h	6,6	6,1	6,1	6,6	6,1	6,6	6,1	6,6
1h	6,4	6,2	6,0	6,4	6,0	6,3	5,7	6,3
3h	5,9	7,3	4,7	5,8	3,4	5,9	3,3	5,7
6h	6,6	8,2	3,0	5,2	2,0	5,2	2,0	5,0
24h	8,8	8,6	1,8	2,4	1,3	2,2	0,0	2,2
48h	8,8	8,2	1,3	1,7	1,0	1,3	0,0	0,0
Cepa ID 57	CONTROL		0,5 mg/L		1,5 mg/L		2,28 mg/L	
0h	6,4	5,9	5,9	6,4	5,9	6,4	5,9	6,4
1h	6,1	6,3	6,0	6,4	5,9	6,1	5,9	6,4
3h	6,0	6,6	5,9	6,0	4,9	6,2	4,4	6,1
6h	5,8	7,8	4,6	5,3	3,2	5,3	2,8	5,4
24h	8,9	8,1	3,5	2,9	2,1	3,1	1,0	2,7
48h	8,9	8,1	2,7	1,7	1,0	1,6	1,0	0,0

En la tabla 23 se muestra la reducción logarítmica del crecimiento bacteriano con moxifloxacino. Éste se comportó, a las 6 horas de incubación, de forma bactericida para tres (ID79, ID28 e ID118) de las seis cepas analizadas (disminución ≥ 3 log), pertenecientes a los serogrupos 1/2a (ECIII), 1/2b y 1/2c, a concentraciones de 2,28 mg/L, 0,5 mg/L y 1,5 mg/L, respectivamente.

En las 3 cepas restantes, ID57, ID49 e ID60, pertenecientes a los serogrupos 4b ECI, 4b ECII y 1/2a ECI, moxifloxacino se comportó de forma bactericida a las 24 horas, a concentraciones de 0,5 mg/L (ID57, ID49) y 1,5 mg/L (ID60).

Tabla 23. Reducción logarítmica de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacino.

Cepa ID 60	Control		0,5 mg/L		1,5 mg/L		2,28 mg/L	
0h	5,6	nd	5,6	log reducec	5,6	log reducec	5,6	log reducec
1h	6,3	nd	6,1	0,5	6,1	0,5	5,8	0,2
3h	6,7	nd	5,8	0,1	5,0	-0,6	4,8	-0,9
6h	7,7	nd	4,9	-0,7	3,5	-2,1	3,1	-2,6
24h	8,5	nd	3,4	-2,2	1,7	-3,9	1,5	-4,1
48h	8,3	nd	1,8	-3,8	1,0	-4,6	0,0	-5,6
Cepa ID 28	Control		0,5 mg/L		1,5 mg/L		2,28 mg/L	
0h	6,0	nd	6,0	log reducec	6,0	log reducec	6,0	log reducec
1h	6,1	nd	6,0	0,1	5,7	-0,2	5,5	-0,4
3h	7,2	nd	4,6	-1,3	3,3	-2,7	3,1	-2,8
6h	7,7	nd	2,8	-3,2	1,3	-4,6	2,0	-3,9
24h	8,3	nd	1,2	-4,7	0,0	-6,0	0,0	-6,0
48h	8,5	nd	0,5	-5,5	0,0	-6,0	0,0	-6,0
Cepa ID 79	Control		0,5 mg/L		1,5 mg/L		2,28 mg/L	
0h	6,0	nd	6,0	log reducec	6,0	log reducec	6,0	log reducec
1h	6,1	nd	6,0	0,0	6,0	0,0	6,0	-0,1
3h	6,8	nd	5,7	-0,3	5,0	-1,0	4,8	-1,2
6h	7,6	nd	4,3	-1,7	3,2	-2,8	2,9	-3,1
24h	8,4	nd	2,0	-4,0	1,2	-4,9	0,5	-5,5
48h	8,4	nd	1,5	-4,5	0,7	-5,4	0,0	-6,0
Cepa ID 118	Control		0,5 mg/L		1,5 mg/L		2,28 mg/L	
0h	5,6	nd	5,6	log reducec	5,6	log reducec	5,6	log reducec
1h	6,1	nd	6,0	0,5	5,8	0,2	5,7	0,1
3h	6,8	nd	5,3	-0,3	3,4	-2,2	3,1	-2,4
6h	8,0	nd	3,5	-2,1	2,3	-3,3	1,6	-4,0
24h	8,3	nd	2,0	-3,6	1,2	-4,4	0,0	-5,6
48h	8,4	nd	1,7	-3,9	0,5	-5,1	0,0	-5,6
Cepa ID 49	Control		0,5 mg/L		1,5 mg/L		2,28 mg/L	
0h	6,3	nd	6,3	log reducec	6,3	log reducec	6,3	log reducec
1h	6,3	nd	6,2	-0,1	6,1	-0,2	6,0	-0,3
3h	6,6	nd	5,3	-1,1	4,6	-1,7	4,5	-1,8
6h	7,4	nd	4,1	-2,2	3,6	-2,8	3,5	-2,8
24h	8,7	nd	2,1	-4,2	1,8	-4,6	1,1	-5,2
48h	8,5	nd	1,5	-4,8	1,1	-5,2	0,0	-6,3
Cepa ID 57	Control		0,5 mg/L		1,5 mg/L		2,28 mg/L	
0h	6,2	nd	6,2	log reducec	6,2	log reducec	6,2	log reducec
1h	6,2	nd	6,2	0,0	6,0	-0,1	6,2	0,0
3h	6,3	nd	5,9	-0,3	5,6	-0,6	5,2	-1,0
6h	6,8	nd	5,0	-1,2	4,2	-1,9	4,1	-2,1
24h	8,5	nd	3,2	-3,0	2,6	-3,6	1,9	-4,3
48h	8,5	nd	2,2	-4,0	1,3	-4,9	0,5	-5,7

*nd: no determinado.

En la tabla 24 queda resumida la reducción logarítmica conjunta de las seis cepas.

Tabla 24. Reducción logarítmica media de las 6 cepas representativas a moxifloxacino.

Tiempo (h)	1CMI	3CMI	C _{max}
3	-0,5	-1,5	-1,7
6	-1,9	-2,9	-3,1
24	-3,6	-4,6	-5,1
48	-4,4	-5,2	-5,9

A concentraciones de 3CMI y C_{max}, moxifloxacino se comporta de manera bactericida a las 6 horas de incubación.

La tasa de muerte definida como la reducción del inóculo inicial a las tres horas de incubación, osciló entre 0,5 y 1,7 log en función de la concentración del antibiótico. El análisis en conjunto de las seis cepas estudiadas demuestra que moxifloxacino fue bactericida a las seis horas de incubación a concentraciones de 3 x CMI y C_{max}, y a las 24 horas a todas las concentraciones.

En las siguientes figuras (Figuras 14-19) se muestra de forma gráfica la evolución temporal del crecimiento bacteriano en presencia y ausencia del antibiótico.

Figura 14. Recuento logarítmico de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacino de la cepa 60.

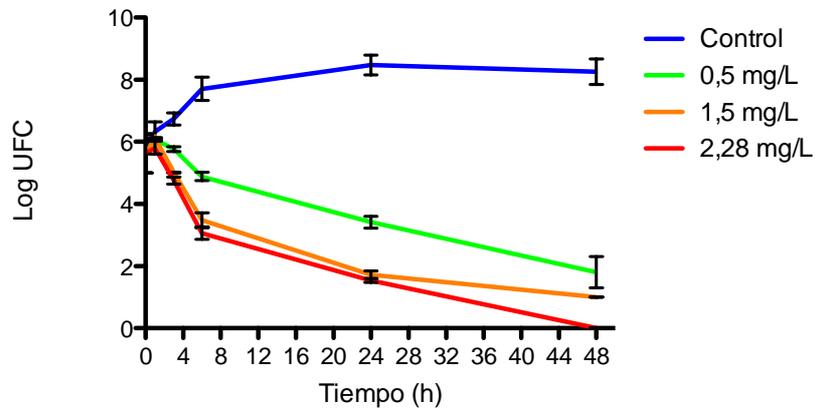


Figura 15. Recuento logarítmico de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacino de la cepa 28.

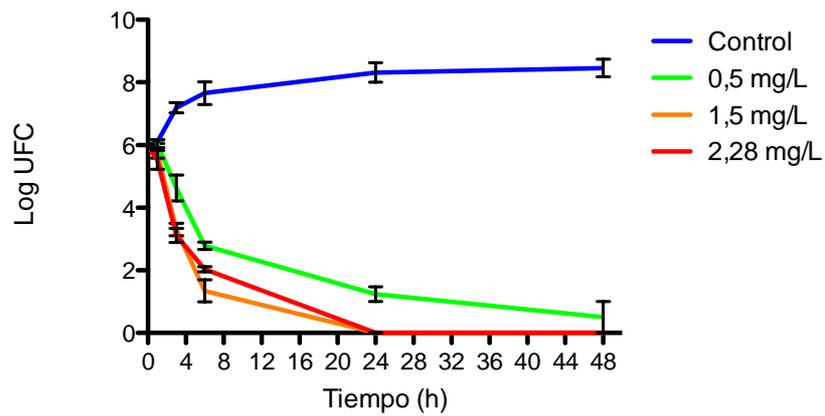


Figura 16. Recuento logarítmico de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacino de la cepa 79.

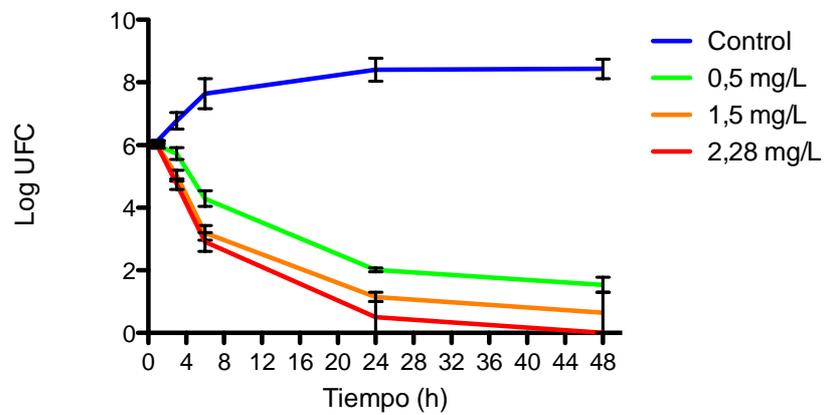


Figura 17. Recuento logarítmico de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacino de la cepa 118.

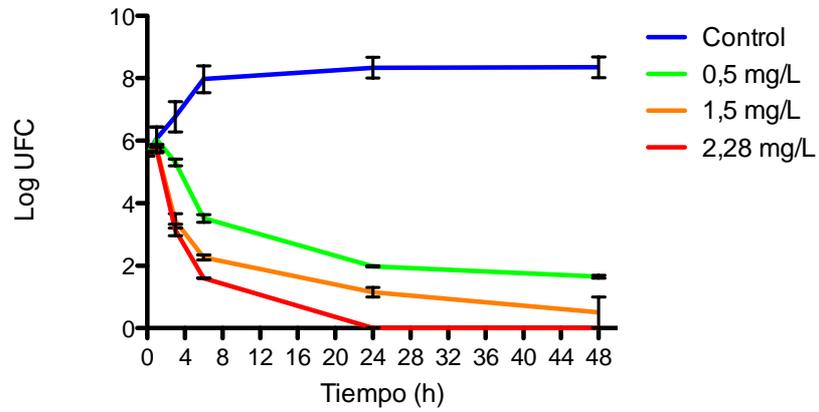


Figura 18. Recuento logarítmico de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacino de la cepa 49.

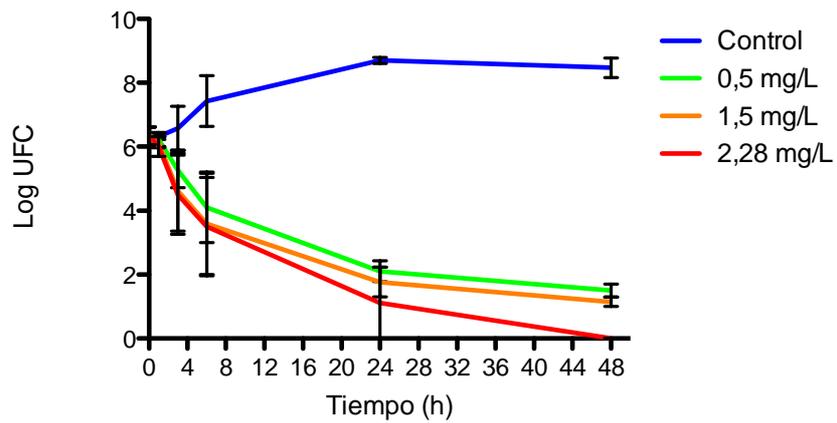
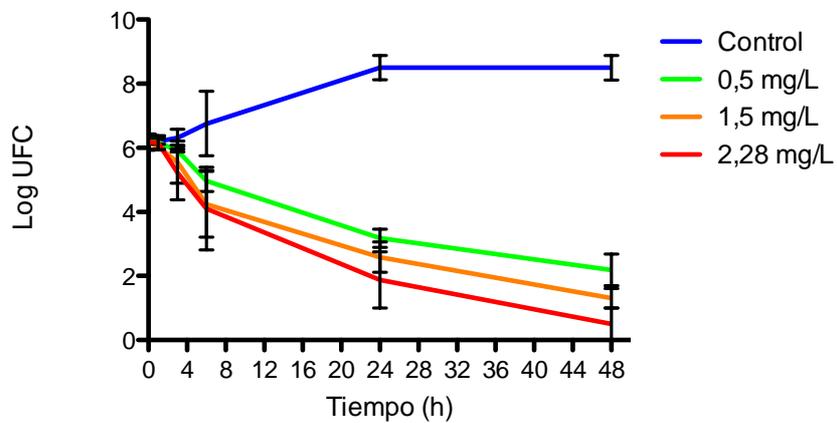


Figura 19. Recuento logarítmico de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacino de la cepa 57.



En la tabla 25 se muestra el área bajo la curva (AUKC) de moxifloxacino dependiendo de la concentración del antibiótico y el tiempo de incubación.

Tabla 25. Área bajo la curva de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacinó.

Cepa ID 60	Control	0,5 mg/L	% reducc	1,5 mg/L	% reducc	2,28 mg/L	% reducc
1h	6,0	5,8	0,0	5,9	0,0	5,7	0,0
3h	19,0	17,7	-0,1	17,0	-0,1	16,3	-0,1
6h	40,7	33,7	-0,2	29,7	-0,3	28,0	-0,3
24h	186,3	108,3	-0,4	76,5	-0,6	69,4	-0,6
48h	387,0	170,9	-0,6	109,2	-0,7	87,9	-0,8
Cepa ID 28	Control	0,5 mg/L	% reducc	1,5 mg/L	% reducc	2,28 mg/L	% reducc
1h	6,0	6,0	0,0	5,9	0,0	5,7	0,0
3h	19,3	16,7	-0,1	14,9	-0,2	14,4	-0,3
6h	41,6	27,8	-0,3	21,9	-0,5	22,1	-0,5
24h	185,3	64,0	-0,7	34,0	-0,8	40,4	-0,8
48h	386,5	84,9	-0,8	34,0	-0,9	40,4	-0,9
Cepa ID 79	Control	0,5 mg/L	% reducc	1,5 mg/L	% reducc	2,28 mg/L	% reducc
1h	6,1	6,0	0,0	6,0	0,0	6,0	0,0
3h	19,0	17,7	-0,1	17,0	-0,1	16,7	-0,1
6h	40,6	32,7	-0,2	29,3	-0,3	28,2	-0,3
24h	185,0	89,5	-0,5	68,4	-0,6	58,9	-0,7
48h	387,0	132,2	-0,7	90,0	-0,8	64,9	-0,8
Cepa ID 118	Control	0,5 mg/L	% reducc	1,5 mg/L	% reducc	2,28 mg/L	% reducc
1h	5,8	5,8	0,0	5,7	0,0	5,6	0,0
3h	18,7	17,2	-0,1	14,9	-0,2	14,5	-0,2
6h	40,8	30,4	-0,3	23,4	-0,4	21,6	-0,5
24h	187,6	79,8	-0,6	54,1	-0,7	36,0	-0,8
48h	387,8	123,4	-0,7	73,9	-0,8	36,0	-0,9
Cepa ID 49	Control	0,5 mg/L	% reducc	1,5 mg/L	% reducc	2,28 mg/L	% reducc
1h	6,3	6,3	0,0	6,2	0,0	6,2	0,0
3h	19,2	17,8	-0,1	17,0	-0,1	16,7	-0,1
6h	40,2	31,8	-0,2	29,3	-0,3	28,7	-0,3
24h	185,4	87,7	-0,5	77,5	-0,6	70,2	-0,6
48h	391,5	130,9	-0,7	112,4	-0,7	83,5	-0,8
Cepa ID 57	Control	0,5 mg/L	% reducc	1,5 mg/L	% reducc	2,28 mg/L	% reducc
1h	6,2	6,2	0,0	6,1	0,0	6,2	0,0
3h	18,7	18,3	0,0	17,7	-0,1	17,6	-0,1
6h	38,3	34,6	-0,1	32,4	-0,2	31,6	-0,2
24h	175,6	107,8	-0,4	93,8	-0,5	85,3	-0,5
48h	379,5	172,2	-0,5	140,5	-0,6	113,8	-0,7

Se pueden observar reducciones desde el 42 al 65% con concentraciones de moxifloxacino de 0,5 mg/L, del 47 al 82% con concentraciones de 1,5 mg/L y del 51 al 81% con concentraciones de 2,28 mg/L a las 24 horas.

En la tabla 26 queda resumida el área bajo la curva conjunta de las seis cepas.

Tabla 26. Área bajo la curva media de las 6 cepas representativas a moxifloxacino.

	% de reducción del AUKC		
% reducc AUKC	1CMI (0,5 mg/L)	3CMI (1,5 mg/L)	Cmax (2,28 mg/L)
3h	-8%	-14%	-16%
6h	-21%	-31%	-34%
24h	-51%	-63%	-67%
48h	-65%	-76%	-82%

La tasa de muerte bacteriana definida como la reducción del inóculo inicial a las tres horas de incubación, osciló entre 8% (-0,5 log) y 16% (-1,7 log), en función de la concentración del antibiótico.

En las siguientes figuras (20-26) se muestra de forma gráfica el área bajo la curva a las diferentes concentraciones y horas.

Figura 20. Área bajo la curva de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacino de la cepa 60.

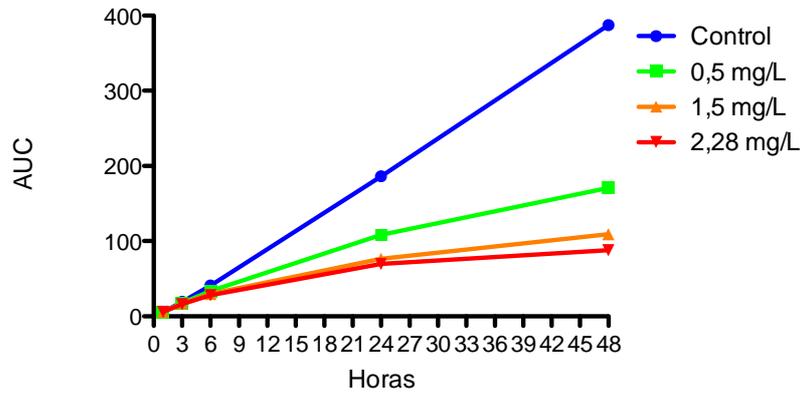


Figura 21. Área bajo la curva de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacino de la cepa 28.

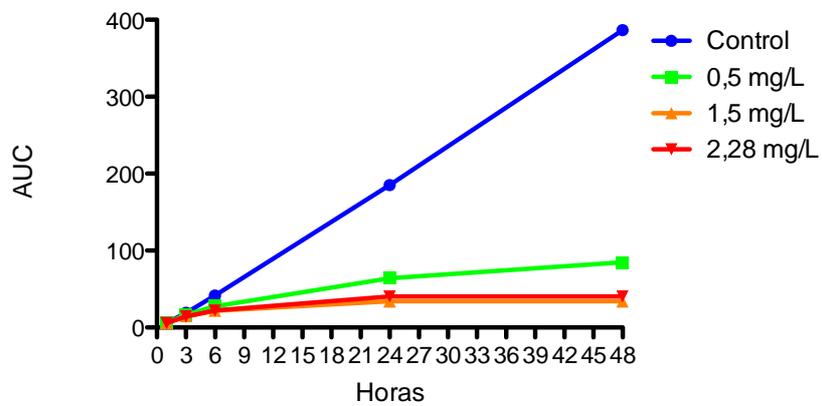


Figura 22. Área bajo la curva de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacino de la cepa 79.

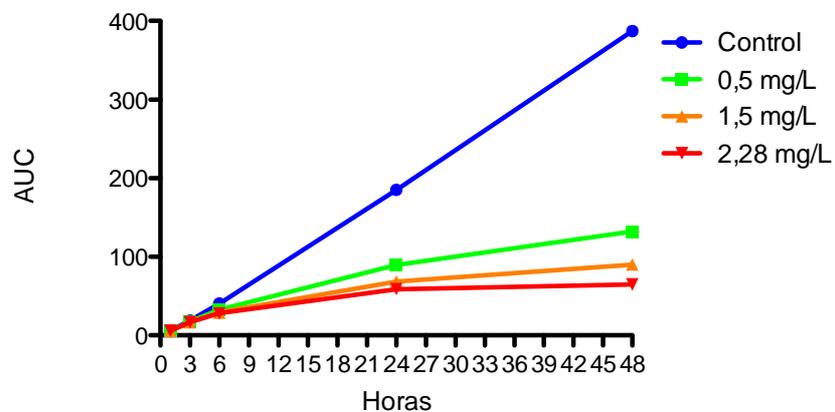


Figura 23. Área bajo la curva de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacino de la cepa 118.

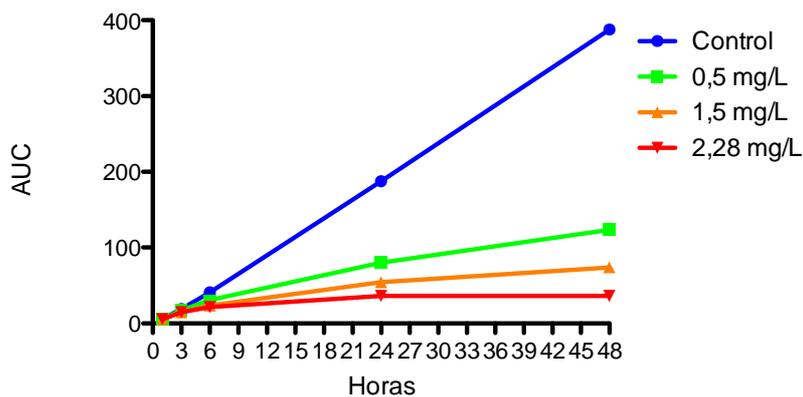


Figura 24. Área bajo la curva de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacino de la cepa 49.

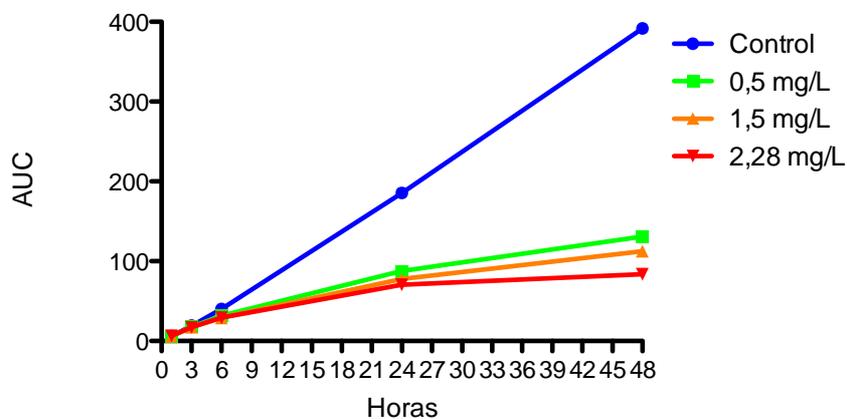
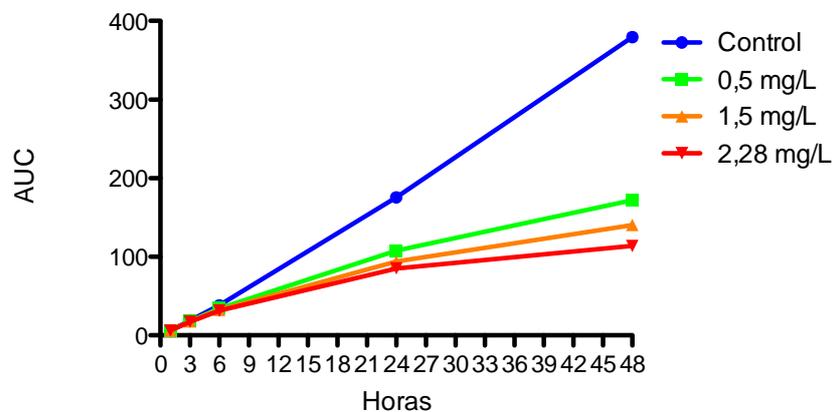


Figura 25. Área bajo la curva de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a moxifloxacino de la cepa 57.



5.3.3 Actividad extracelular de ampicilina

En las tablas siguientes se incluye el recuento bacteriano (tabla 27) y logarítmico inicial (tabla 28), a las horas 1, 3, 6, 24 y 48 de las seis cepas, tanto en el grupo control como con las diferentes concentraciones de ampicilina.

Tabla 27. Recuento bacteriano de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina.

Cepa ID 60	CONTROL		0,5 mg/L		1,5 mg/L		24,5 mg/L		49 mg/L	
0h	1008000	500000	1008000	500000	1008000	500000	1008000	500000	1008000	500000
1h	1280000	1700000	1352000	1400000	1096000	700000	896000	1100000	632000	900000
3h	9800000	4500000	1416000	1100000	1128000	800000	1072000	900000	1216000	900000
6h	117600000	43200000	928000	600000	1264000	600000	1288000	700000	1272000	800000
24h	500000000	130000000	135000	52000	292000	152000	144000	228000	160000	136000
48h	510000000	120000000	830	1400	1090	1800	80	140	50	50
Cepa ID 28	CONTROL		0,5 mg/L		1,5 mg/L		24,5 mg/L		49 mg/L	
0h	1416000	1052000	1416000	1052000	1416000	1052000	1416000	1052000	1416000	1052000
1h	1681000	1260000	1120000	1200000	992000	1260000	920000	1148000	1176000	1080000
3h	7800000	6800000	1488000	1164000	1024000	1192000	1024000	1192000	968000	1172000
6h	119200000	78800000	1656000	1240000	1224000	1148000	944000	932000	1072000	1004000
24h	430000000	410000000	1128000	276000	132000	288000	156000	196000	53000	74000
48h	330000000	440000000	29000	9400	250	200	110	170	70	120
Cepa ID 79	CONTROL		0,5 mg/L		1,5 mg/L		24,5 mg/L		49 mg/L	
0h	524000	1428000	524000	1428000	524000	1428000	524000	1428000	524000	1428000
1h	780000	1756000	640000	1400000	626000	1312000	736000	1424000	602000	1380000
3h	3600000	10800000	1288000	1736000	666000	1236000	670000	872000	720000	1384000
6h	47200000	136400000	4500000	8400000	692000	1208000	552000	1448000	616000	1396000
24h	103600000	520000000	8000000	1012000	30000	57000	1500	19000	500	30000
48h	94400000	440000000	7600000	352000	100	110	40	10	30	0
Cepa ID 118	CONTROL		0,5 mg/L		1,5 mg/L		24,5 mg/L		49 mg/L	
0h	388000	1064000	388000	1064000	388000	1064000	388000	1064000	388000	1064000
1h	636000	1176000	496000	776000	444000	1192000	482000	808000	432000	1016000
3h	2100000	10400000	948000	1912000	588000	1296000	436000	864000	424000	856000
6h	38000000	116800000	1024000	10900000	552000	728000	480000	856000	448000	792000
24h	100000000	650000000	1000000	8600000	35000	49000	78000	69000	69000	113000
48h	130000000	750000000	6600000	992000	450	1400	40	80	10	30
Cepa ID 49	CONTROL		0,5 mg/L		1,5 mg/L		24,5 mg/L		49 mg/L	
0h	880000	1588000	880000	1588000	880000	1588000	880000	1588000	880000	1588000
1h	1782000	1100000	1266000	1380000	974000	1300000	968000	1044000	848000	1316000
3h	12900000	12000000	1464000	2156000	992000	1300000	864000	1372000	856000	1516000
6h	141600000	161600000	3400000	6800000	752000	1240000	632000	1496000	640000	1252000
24h	620000000	790000000	850000	5000000	3520	3120	460	840	310	560
48h	120000000	550000000	23700000	20000000	130	100	40	120	50	100
Cepa ID 57	CONTROL		0,5 mg/L		1,5 mg/L		24,5 mg/L		49 mg/L	
0h	604000	1872000	604000	1872000	604000	1872000	604000	1872000	604000	1872000
1h	680000	2056000	652000	1616000	616000	1744000	596000	1596000	564000	1752000
3h	3200000	12000000	844000	3032000	716000	1464000	632000	1544000	608000	1800000
6h	40800000	168000000	2100000	6100000	564000	1408000	584000	2088000	580000	1856000
24h	116400000	610000000	1300000	1224000	1270	2840	3000	1280	2000	830
48h	100800000	540000000	41200000	1096000	70	180	70	200	120	110

Tabla 28. Recuento logarítmico de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina.

Cepa ID 60	CONTROL		0,5 mg/L		1,5 mg/L		24,5 mg/L		49 mg/L	
0h	6,0	5,7	6,0	5,7	6,0	5,7	6,0	5,7	6,0	5,7
1h	6,1	6,2	6,0	6,1	6,0	5,8	6,0	6,0	5,8	6,0
3h	7,0	6,7	6,1	6,0	6,1	5,9	6,0	6,0	6,1	6,0
6h	8,1	7,6	6,2	5,8	6,1	5,8	6,1	5,8	6,1	5,9
24h	8,7	8,1	5,1	4,7	5,5	5,2	5,2	5,4	5,2	5,1
48h	8,7	8,1	2,9	3,1	3,0	3,3	1,9	2,1	1,7	1,7
Cepa ID 28	CONTROL		0,5 mg/L		1,5 mg/L		24,5 mg/L		49 mg/L	
0h	6,2	6,0	6,2	6,0	6,2	6,0	6,2	6,0	6,2	6,0
1h	6,2	6,1	6,0	6,1	6,0	6,1	6,0	6,1	6,1	6,0
3h	6,9	6,8	6,2	6,1	6,0	6,1	6,1	6,0	6,0	6,1
6h	8,1	7,9	6,2	6,1	6,1	6,1	6,0	6,0	6,0	6,0
24h	8,6	8,6	6,1	5,4	5,1	5,5	5,2	5,3	4,7	4,9
48h	8,5	8,6	4,5	4,0	2,4	2,3	2,0	2,2	1,8	2,1
Cepa ID 79	CONTROL		0,5 mg/L		1,5 mg/L		24,5 mg/L		49 mg/L	
0h	5,7	6,2	5,7	6,2	5,7	6,2	5,7	6,2	5,7	6,2
1h	5,9	6,2	5,8	6,1	5,8	6,1	5,9	6,2	5,8	6,1
3h	6,6	7,0	6,1	6,2	5,8	6,1	5,8	5,9	5,9	6,1
6h	7,7	8,1	6,7	6,9	5,8	6,1	5,7	6,2	5,8	6,1
24h	8,0	8,7	6,9	6,0	4,5	4,8	3,5	4,3	2,7	4,5
48h	8,0	8,6	6,9	5,5	2,0	2,0	1,6	1,0	1,5	0,0
Cepa ID 118	CONTROL		0,5 mg/L		1,5 mg/L		24,5 mg/L		49 mg/L	
0h	5,6	6,0	5,6	6,0	5,6	6,0	5,6	6,0	5,6	6,0
1h	5,8	6,1	5,7	5,9	5,6	6,1	5,7	5,9	5,6	6,0
3h	6,3	7,0	6,0	6,3	5,8	6,1	5,6	5,9	5,6	5,9
6h	7,6	8,1	6,0	7,0	5,7	5,9	5,7	5,9	5,7	5,9
24h	8,0	8,8	6,0	6,9	4,5	4,7	4,9	4,8	4,8	5,1
48h	8,1	8,9	6,8	6,0	2,7	3,1	1,6	1,9	1,0	1,5
Cepa ID 49	CONTROL		0,5 mg/L		1,5 mg/L		24,5 mg/L		49 mg/L	
0h	5,9	6,2	5,9	6,2	5,9	6,2	5,9	6,2	5,9	6,2
1h	6,3	6,0	6,1	6,1	6,0	6,1	6,0	6,0	5,9	6,1
3h	7,1	7,1	6,2	6,3	6,0	6,1	5,9	6,1	5,9	6,2
6h	8,2	8,2	6,5	6,8	5,9	6,1	5,8	6,2	5,8	6,1
24h	8,8	8,9	5,9	6,7	3,5	3,5	2,7	2,9	2,5	2,7
48h	8,1	8,7	7,4	7,3	2,1	2,0	1,6	2,1	1,7	2,0
Cepa ID 57	CONTROL		0,5 mg/L		1,5 mg/L		24,5 mg/L		49 mg/L	
0h	5,8	6,3	5,8	6,3	5,8	6,3	5,8	6,3	5,8	6,3
1h	5,8	6,3	5,8	6,2	5,8	6,2	5,8	6,2	5,8	6,2
3h	6,5	7,1	5,9	6,5	5,9	6,2	5,8	6,2	5,8	6,3
6h	7,6	8,2	6,3	6,8	5,8	6,1	5,8	6,3	5,8	6,3
24h	8,1	8,8	6,1	6,1	3,1	3,5	3,5	3,1	3,3	2,9
48h	8,0	8,7	7,6	6,0	1,8	2,3	1,8	2,3	2,1	2,0

En la tabla 29, se muestra la reducción logarítmica del crecimiento bacteriano obtenida con las diferentes concentraciones de ampicilina, que nos permitirá predecir el comportamiento bacteriostático o bactericida del antibiótico. Ampicilina se comportó de forma bacteriostática (disminución del inóculo <2 log) con todas las cepas evaluadas mediante curvas de tiempo-

muerte, alcanzándose solo actividad bactericida a las 48 horas del inóculo inicial y con concentraciones variables de antibiótico dependiendo de la cepa estudiada. Para las cepas ID28, ID79 e ID57, pertenecientes a los serogrupos 1/2b, 1/2a (ECIII) y 4b (ECI), respectivamente, ampicilina fue bactericida a las 48 horas a una concentración de 1,5 mg/L. En el caso de las cepas ID60 e ID118, pertenecientes a los serogrupos 1/2a (ECI) y 1/2c, fue bactericida a las 48 horas a una concentración mucho más elevada (24,5 mg/L).

Con la cepa ID49, perteneciente el serogrupo 4b (ECII), ampicilina se comportó de forma bactericida a las 48 horas a una concentración de 1,5 mg/L, al igual que las primeras cepas estudiadas, pero a diferencia de éstas con altas concentraciones (24,5 mg/L), se muestra bactericida a las 24 horas.

Tabla 29. Reducción logarítmica de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina.

Cepa ID 60	Control		0,5 mg/L		1,5 mg/L		24,5 mg/L		49 mg/L	
0h	5,9	nd	5,9	log reduce	5,9	log reduce	5,9	log reduce	5,9	log reduce
1h	6,2	nd	6,1	0,2	5,9	0,1	6,0	0,1	5,9	0,0
3h	6,8	nd	6,1	0,2	6,0	0,1	6,0	0,1	6,0	0,2
6h	7,9	nd	6,0	0,1	5,9	0,1	6,0	0,1	6,0	0,2
24h	8,4	nd	4,9	-0,9	5,3	-0,5	5,3	-0,6	5,2	-0,7
48h	8,4	nd	3,1	-2,7	3,0	-2,8	2,0	-3,8	1,7	-4,2
Cepa ID 28	Control		0,5 mg/L		1,5 mg/L		24,5 mg/L		49 mg/L	
0h	6,1	nd	6,1	log reduce	6,1	log reduce	6,1	log reduce	6,1	log reduce
1h	6,2	nd	6,1	0,0	6,0	0,0	6,0	-0,1	6,1	0,0
3h	6,9	nd	6,1	0,0	6,0	0,0	6,0	-0,1	6,0	-0,1
6h	8,0	nd	6,2	0,1	6,1	0,0	6,0	-0,1	6,0	-0,1
24h	8,6	nd	5,7	-0,3	5,3	-0,8	5,2	-0,8	4,8	-1,3
48h	8,6	nd	4,2	-1,9	2,3	-3,7	2,1	-4,0	2,0	-4,1
Cepa ID 79	Control		0,5 mg/L		1,5 mg/L		24,5 mg/L		49 mg/L	
0h	5,9	nd	5,9	log reduce	5,9	log reduce	5,9	log reduce	5,9	log reduce
1h	6,1	nd	6,0	0,0	6,0	0,0	6,0	0,1	6,0	0,0
3h	6,8	nd	6,2	0,2	6,0	0,0	5,9	-0,1	6,0	0,1
6h	7,9	nd	6,8	0,9	6,0	0,0	6,0	0,0	6,0	0,0
24h	8,4	nd	6,5	0,5	4,6	-1,3	3,9	-2,0	3,6	-2,3
48h	8,3	nd	6,2	0,3	2,0	-3,9	1,3	-4,6	0,7	-5,2
Cepa ID 118	Control		0,5 mg/L		1,5 mg/L		24,5 mg/L		49 mg/L	
0h	5,8	nd	5,8	log reduce	5,8	log reduce	5,8	log reduce	5,8	log reduce
1h	5,9	nd	5,8	0,0	5,9	0,1	5,8	0,0	5,8	0,0
3h	6,7	nd	6,1	0,3	5,9	0,1	5,8	0,0	5,8	0,0
6h	7,8	nd	6,5	0,7	5,8	0,0	5,8	0,0	5,8	0,0
24h	8,4	nd	6,5	0,7	4,6	-1,2	4,9	-0,9	4,9	-0,9
48h	8,5	nd	6,4	0,6	2,9	-2,9	1,8	-4,1	1,2	-4,6
Cepa ID 49	Control		0,5 mg/L		1,5 mg/L		24,5 mg/L		49 mg/L	
0h	6,1	nd	6,1	log reduce	6,1	log reduce	6,1	log reduce	6,1	log reduce
1h	6,1	nd	6,1	0,0	6,1	0,0	6,0	-0,1	6,0	0,0
3h	7,1	nd	6,2	0,2	6,1	0,0	6,0	0,0	6,1	0,0
6h	8,2	nd	6,7	0,6	6,0	-0,1	6,0	-0,1	6,0	-0,1
24h	8,8	nd	6,3	0,2	3,5	-2,6	2,8	-3,3	2,6	-3,5
48h	8,4	nd	7,3	1,3	2,1	-4,0	1,8	-4,2	1,8	-4,2
Cepa ID 57	Control		0,5 mg/L		1,5 mg/L		24,5 mg/L		49 mg/L	
0h	6,0	nd	6,0	log reduce	6,0	log reduce	6,0	log reduce	6,0	log reduce
1h	6,1	nd	6,0	0,0	6,0	0,0	6,0	0,0	6,0	0,0
3h	6,8	nd	6,2	0,2	6,0	0,0	6,0	0,0	6,0	0,0
6h	7,9	nd	6,6	0,5	5,9	-0,1	6,0	0,0	6,0	0,0
24h	8,4	nd	6,1	0,1	3,3	-2,7	3,3	-2,7	3,1	-2,9
48h	8,4	nd	6,8	0,8	2,1	-4,0	2,1	-4,0	2,1	-4,0

*nd: no determinado.

La tasa de muerte definida como la reducción del inóculo inicial a las tres horas de incubación, fue cercana a cero en todas las concentraciones probadas.

El análisis en conjunto de las seis cepas estudiadas demuestra que ampicilina fue bactericida sólo a las 48 horas de incubación, tanto a concentraciones bajas (1,5 mg/L) como altas (24,5 y 49 mg/L), con reducciones medias del inóculo inicial que oscilan entre 3,6 y 4,4 log. Sin embargo, en una cepa del serotipo 4b, esta actividad bactericida podría adelantarse a las 24 horas con una reducción de 3,2 y 3,4 log con concentraciones altas de 24,5 y 49 mg/L respectivamente.

Ampicilina no demostró tener actividad bactericida según la definición, la muerte de al menos el 99,9% del inóculo inicial después de 24 horas de incubación (reducción de al menos 3log UFC/mL) (tabla 30).

Tabla 30. Reducción logarítmica media de las 6 cepas representativas a ampicilina.

Tiempo (h)	1CMI	3CMI	Cmax1	Cmax2
3	0,2	0,0	0,0	0,0
6	0,5	0,0	0,0	0,0
24	0,0	-1,5	-1,7	-1,9
48	-0,3	-3,6	-4,1	-4,4

En las siguientes figuras (26-31) podemos ver las curvas del crecimiento bacteriano con y sin antibiótico de las diferentes cepas.

Figura 26. Recuento logarítmico de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina de la cepa 60.

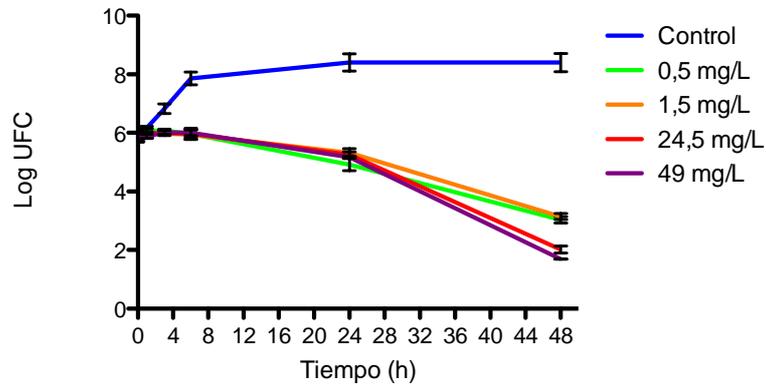


Figura 27. Recuento logarítmico de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina de la cepa 28.

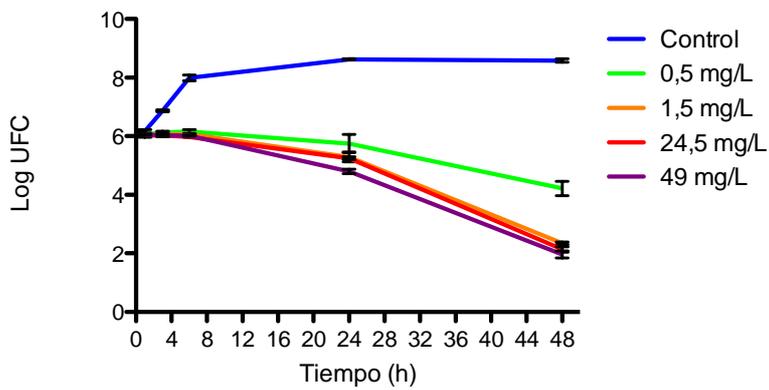


Figura 28. Recuento logarítmico de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina de la cepa 79.

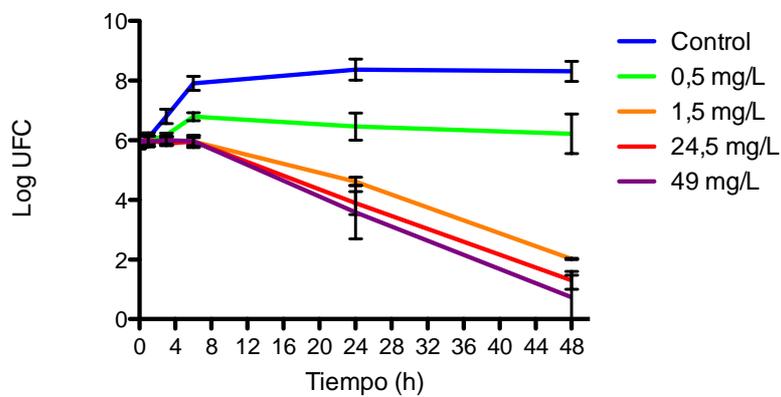


Figura 29. Recuento logarítmico de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina de la cepa 118.

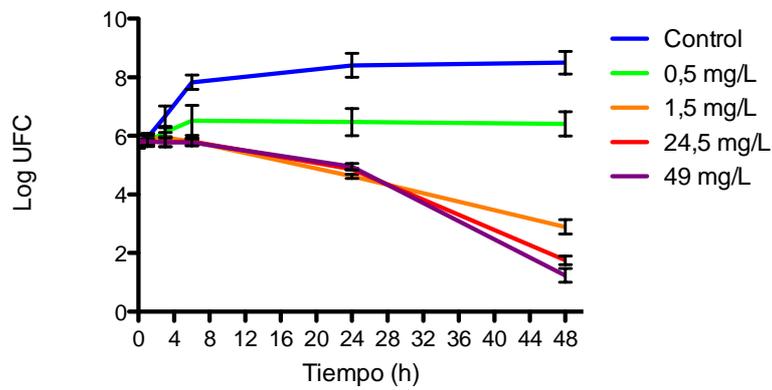


Figura 30. Recuento logarítmico de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina de la cepa 49.

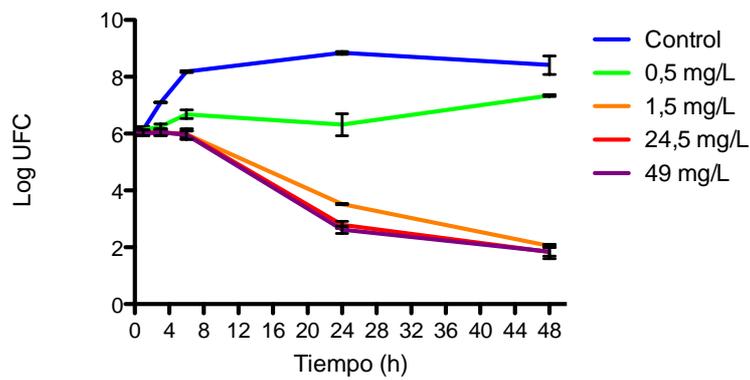
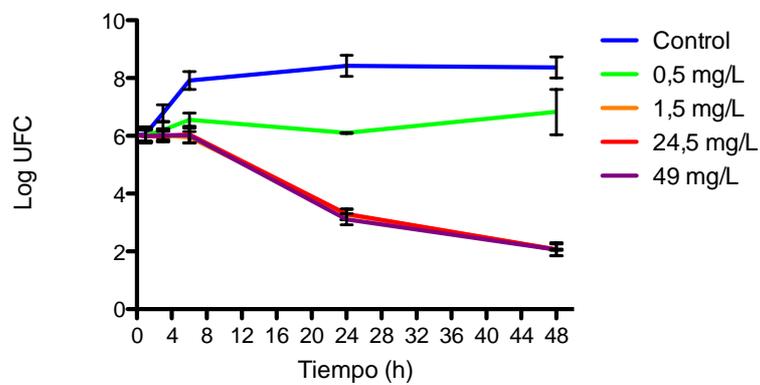


Figura 31. Recuento logarítmico de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina de la cepa 57.



En la tabla 31 se muestra el área bajo la curva (AUKC) de ampicilina según la concentración del antibiótico y el tiempo de incubación.

Tabla 31. Área bajo la curva de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina.

Cepa ID 60	Control	0,5 mg/L	% reducc	1,5 mg/L	% reducc	2,28 mg/L	% reducc
1h	6,0	5,8	0,0	5,9	0,0	5,7	0,0
3h	19,0	17,7	-0,1	17,0	-0,1	16,3	-0,1
6h	40,7	33,7	-0,2	29,7	-0,3	28,0	-0,3
24h	186,3	108,3	-0,4	76,5	-0,6	69,4	-0,6
48h	387,0	170,9	-0,6	109,2	-0,7	87,9	-0,8
Cepa ID 28	Control	0,5 mg/L	% reducc	1,5 mg/L	% reducc	2,28 mg/L	% reducc
1h	6,0	6,0	0,0	5,9	0,0	5,7	0,0
3h	19,3	16,7	-0,1	14,9	-0,2	14,4	-0,3
6h	41,6	27,8	-0,3	21,9	-0,5	22,1	-0,5
24h	185,3	64,0	-0,7	34,0	-0,8	40,4	-0,8
48h	386,5	84,9	-0,8	34,0	-0,9	40,4	-0,9
Cepa ID 79	Control	0,5 mg/L	% reducc	1,5 mg/L	% reducc	2,28 mg/L	% reducc
1h	6,1	6,0	0,0	6,0	0,0	6,0	0,0
3h	19,0	17,7	-0,1	17,0	-0,1	16,7	-0,1
6h	40,6	32,7	-0,2	29,3	-0,3	28,2	-0,3
24h	185,0	89,5	-0,5	68,4	-0,6	58,9	-0,7
48h	387,0	132,2	-0,7	90,0	-0,8	64,9	-0,8
Cepa ID 118	Control	0,5 mg/L	% reducc	1,5 mg/L	% reducc	2,28 mg/L	% reducc
1h	5,8	5,8	0,0	5,7	0,0	5,6	0,0
3h	18,7	17,2	-0,1	14,9	-0,2	14,5	-0,2
6h	40,8	30,4	-0,3	23,4	-0,4	21,6	-0,5
24h	187,6	79,8	-0,6	54,1	-0,7	36,0	-0,8
48h	387,8	123,4	-0,7	73,9	-0,8	36,0	-0,9
Cepa ID 49	Control	0,5 mg/L	% reducc	1,5 mg/L	% reducc	2,28 mg/L	% reducc
1h	6,3	6,3	0,0	6,2	0,0	6,2	0,0
3h	19,2	17,8	-0,1	17,0	-0,1	16,7	-0,1
6h	40,2	31,8	-0,2	29,3	-0,3	28,7	-0,3
24h	185,4	87,7	-0,5	77,5	-0,6	70,2	-0,6
48h	391,5	130,9	-0,7	112,4	-0,7	83,5	-0,8
Cepa ID 57	Control	0,5 mg/L	% reducc	1,5 mg/L	% reducc	2,28 mg/L	% reducc
1h	6,2	6,2	0,0	6,1	0,0	6,2	0,0
3h	18,7	18,3	0,0	17,7	-0,1	17,6	-0,1
6h	38,3	34,6	-0,1	32,4	-0,2	31,6	-0,2
24h	175,6	107,8	-0,4	93,8	-0,5	85,3	-0,5
48h	379,5	172,2	-0,5	140,5	-0,6	113,8	-0,7

Se puede observar la reducción del inóculo bacteriano a las 24 horas en un rango del 16 al 28% a concentraciones de ampicilina de 0,5 mg/L, del 27 al 38% a concentraciones de 1,5 mg/L, y en torno al 27-42% a altas concentraciones del antibiótico (24-49 mg/L).

En la siguiente tabla queda resumida el área bajo la curva conjunta de las seis cepas.

Tabla 32. Área bajo la curva de las 6 cepas representativas a ampicilina.

% reducc AUKC	1xCMI (0,5 mg/L)	3xCMI (1,5 mg/L)	Cmax1 (24,5 mg/L)	Cmax2 (49 mg/L)
3h	-4%	-5%	-6%	-6%
6h	-10%	-13%	-13%	-13%
24h	-21%	-32%	-33%	-33%
48h	-26%	-46%	-49%	-51%

La tasa de muerte definida como la reducción del inóculo inicial a las tres horas de incubación, osciló entre 4-6% en función de la concentración del antibiótico.

En las siguientes figuras se muestra el área bajo la curva de las seis cepas a diferentes concentraciones y horas.

Figura 32. Área bajo la curva de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina de la cepa 60.

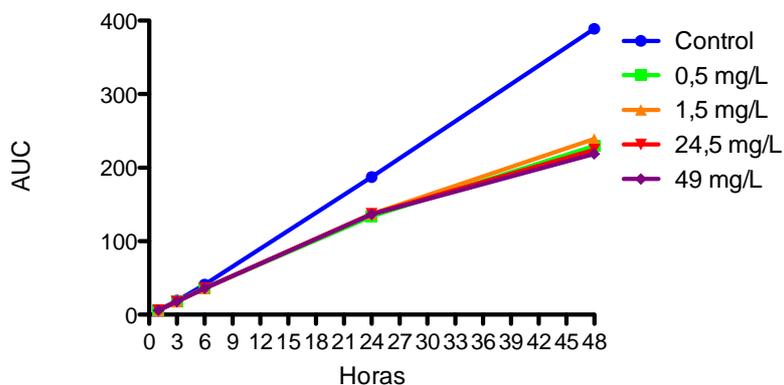


Figura 33. Área bajo la curva de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina de la cepa 28.

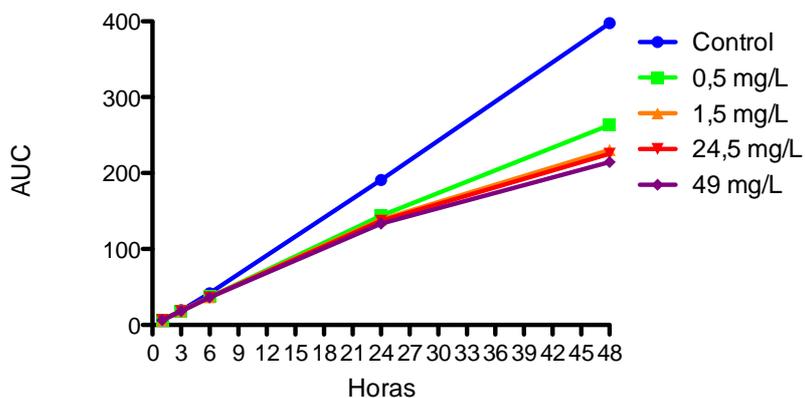


Figura 34. Área bajo la curva de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina de la cepa 79.

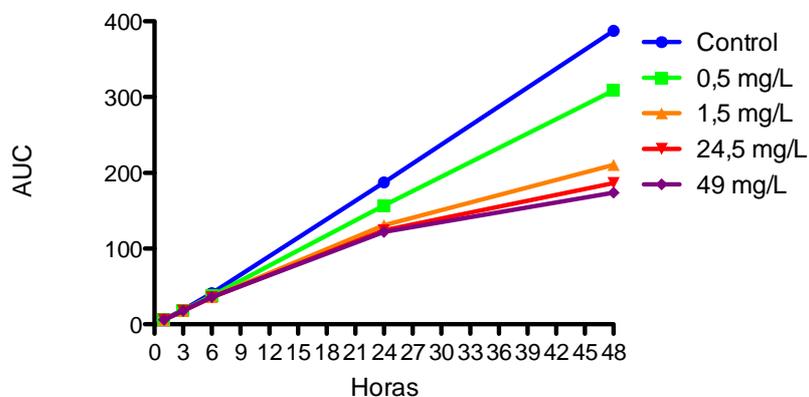


Figura 35. Área bajo la curva de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina de la cepa 118.

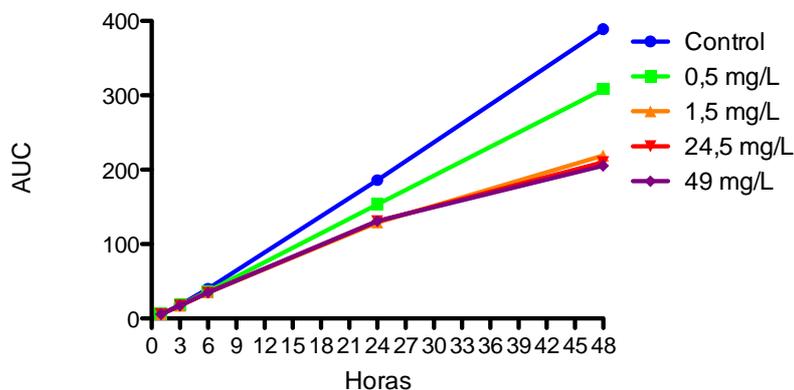


Figura 36. Área bajo la curva de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina de la cepa 49.

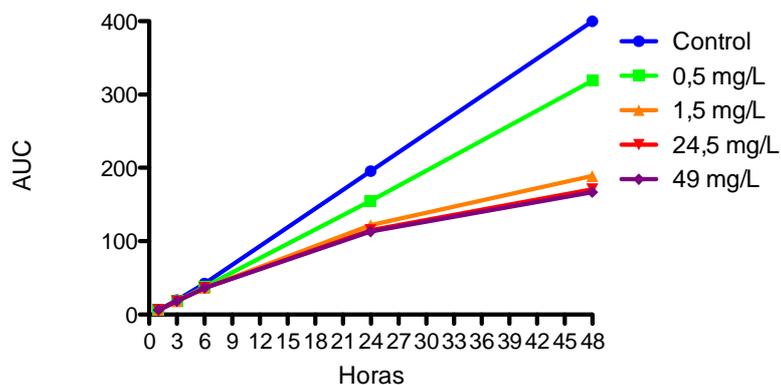
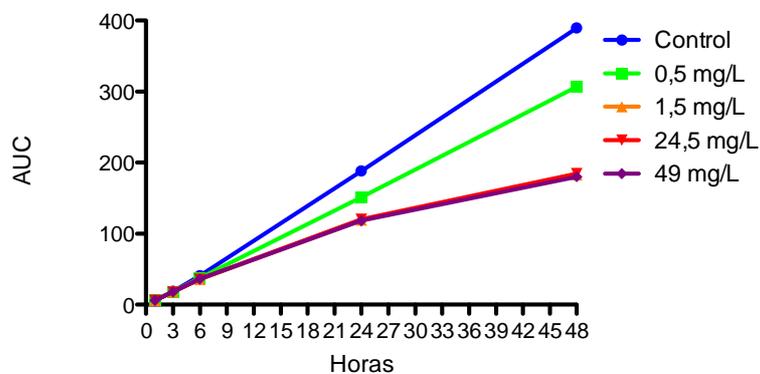


Figura 37. Área bajo la curva de la actividad extracelular mediante curvas de tiempo-muerte a ampicilina de la cepa 57.



5.3.4 Actividad extracelular de ampicilina más moxifloxacino

En las tablas siguientes se incluye el recuento bacteriano (tabla 33) y logarítmico (tabla 34) inicial y a las diferentes horas de incubación de las seis cepas, tanto en el grupo control como a las diferentes concentraciones de la combinación de ambos antibióticos.

Tabla 33. Recuento bacteriano de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte.

Cepa ID 60	CONTROL		CMI		3CMI		C MAX	
0h	1000000	860000	1000000	860000	1000000	860000	1000000	860000
1h	1100000	884000	1152000	744000	700000	624000	800000	712000
3h	4700000	5900000	972000	592000	500000	436000	528000	520000
6h	51600000	56800000	512000	340000	328000	216000	428000	288000
24h	118400000	101200000	19000	5160	14000	5480	800	400
48h	144000000	100000000	100	250	90	80	0	0
Cepa ID 28	CONTROL		CMI		3CMI		C MAX	
0h	680000	616000	616000	680000	616000	680000	616000	680000
1h	696000	708000	596000	744000	544000	500000	476000	376000
3h	2800000	5000000	344000	428000	117000	110000	122000	156000
6h	43200000	33600000	73000	77000	27000	40000	17000	10920
24h	96400000	109600000	70	120	20	30	0	10
48h	84400000	113600000	0	0	0	0	0	0
Cepa ID 79	CONTROL		CMI		3CMI		C MAX	
0h	1184000	440000	440000	1184000	440000	1184000	440000	1184000
1h	1496000	692000	540000	1232000	576000	964000	540000	864000
3h	5400000	4200000	512000	808000	364000	852000	328000	768000
6h	60800000	47600000	268000	412000	168000	400000	144000	41200
24h	112000000	94800000	2030	2520	1220	5400	950	300
48h	101600000	84000000	20	40	0	0	0	0
Cepa ID 118	CONTROL		CMI		3CMI		C MAX	
0h	724000	520000	520000	724000	520000	724000	520000	724000
1h	632000	644000	528000	696000	572000	484000	520000	744000
3h	2500000	2100000	256000	448000	212000	336000	352000	572000
6h	47600000	44000000	49000	252000	108000	276000	156000	300000
24h	142400000	100800000	970	2110	90	240	70	10
48h	82400000	105600000	10	50	0	20	0	0
Cepa ID 49	CONTROL		CMI		3CMI		C MAX	
0h	816000	752000	752000	816000	752000	816000	752000	816000
1h	844000	852000	800000	712000	484000	680000	480000	544000
3h	4500000	4300000	432000	424000	176000	280000	256000	304000
6h	35200000	13500000	115000	240000	37000	88000	87000	176000
24h	131200000	147200000	110	110	40	60	30	20
48h	99200000	109600000	30	50	10	20	10	0
Cepa ID 57	CONTROL		CMI		3CMI		C MAX	
0h	500000	752000	752000	500000	752000	500000	752000	500000
1h	676000	756000	668000	664000	632000	644000	792000	620000
3h	2300000	3200000	652000	524000	360000	296000	448000	390000
6h	34400000	36000000	284000	180000	108000	99000	192000	262000
24h	100800000	145600000	310	160	170	50	110	30
48h	122000000	100800000	60	30	30	20	10	0

Tabla 34. Recuento logarítmico de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte.

Cepa ID 60	CONTROL		CMI		3CMI		C MAX	
0h	6	5,9	6,0	5,9	6,0	5,9	6,0	5,9
1h	6,0	5,9	6,1	5,9	5,8	5,8	5,9	5,9
3h	6,7	6,8	6,0	5,8	5,7	5,6	5,7	5,7
6h	7,7	7,8	5,7	5,5	5,5	5,3	5,6	5,5
24h	8,1	8,0	4,3	3,7	4,1	3,7	2,9	2,6
48h	8,2	8,0	2,0	2,4	2,0	1,9	0,0	0,0
Cepa ID 28	CONTROL		CMI		3CMI		C MAX	
0h	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8
1h	5,8	5,9	5,8	5,9	5,7	5,7	5,7	5,6
3h	6,4	6,7	5,5	5,6	5,1	5,0	5,1	5,2
6h	7,6	7,5	4,9	4,9	4,4	4,6	4,2	4,0
24h	8,0	8,0	1,8	2,1	1,3	1,5	0,0	1,0
48h	7,9	8,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cepa ID 79	CONTROL		CMI		3CMI		C MAX	
0h	6,1	5,6	5,6	6,1	5,6	6,1	5,6	6,1
1h	6,2	5,8	5,7	6,1	5,8	6,0	5,7	5,9
3h	6,7	6,6	5,7	5,9	5,6	5,9	5,5	5,9
6h	7,8	7,7	5,4	5,6	5,2	5,6	5,2	4,6
24h	8,0	8,0	3,3	3,4	3,1	3,7	3,0	2,5
48h	8,0	7,9	1,3	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0
Cepa ID 118	CONTROL		CMI		3CMI		C MAX	
0h	5,9	5,7	5,7	5,9	5,7	5,9	5,7	5,9
1h	5,8	5,8	5,7	5,8	5,8	5,7	5,7	5,9
3h	6,4	6,3	5,4	5,7	5,3	5,5	5,5	5,8
6h	7,7	7,6	4,7	5,4	5,0	5,4	5,2	5,5
24h	8,2	8,0	3,0	3,3	2,0	2,4	1,8	1,0
48h	7,9	8,0	1,0	1,7	0,0	1,3	0,0	0,0
Cepa ID 49	CONTROL		CMI		3CMI		C MAX	
0h	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9
1h	5,9	5,9	5,9	5,9	5,7	5,8	5,7	5,7
3h	6,7	6,6	5,6	5,6	5,2	5,4	5,4	5,5
6h	7,5	7,1	5,1	5,4	4,6	4,9	4,9	5,2
24h	8,1	8,2	2,0	2,0	1,6	1,8	1,5	1,3
48h	8,0	8,0	1,5	1,7	1,0	1,3	1,0	0,0
Cepa ID 57	CONTROL		CMI		3CMI		C MAX	
0h	5,7	5,9	5,9	5,7	5,9	5,7	5,9	5,7
1h	5,8	5,9	5,8	5,8	5,8	5,8	5,9	5,8
3h	6,4	6,5	5,8	5,7	5,6	5,5	5,7	5,6
6h	7,5	7,6	5,5	5,3	5,0	5,0	5,3	5,4
24h	8,0	8,2	2,5	2,2	2,2	1,7	2,0	1,5
48h	8,1	8,0	1,8	1,5	1,5	1,3	1,0	0,0

En la tabla 35 se muestra la reducción logarítmica. La combinación de ambos antibióticos no produjo efecto sinérgico, definido como la reducción del inóculo inicial de al menos 2 log comparándolo con el antibiótico más activo, en este caso, moxifloxacino.

Tabla 35. Reducción logarítmica de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte.

Cepa ID 60	Control		CMI		3CMI		C MAX	
0h	6,0	nd	6,0	log reducec	6,0	log reducec	6,0	log reducec
1h	6,0	nd	6,0	0,0	5,8	-0,1	5,9	-0,1
3h	6,7	nd	5,9	-0,1	5,7	-0,3	5,7	-0,2
6h	7,7	nd	5,6	-0,3	5,4	-0,5	5,5	-0,4
24h	8,0	nd	4,0	-2,0	3,9	-2,0	2,8	-3,2
48h	8,3	nd	2,2	-3,8	1,9	-4,0	0,0	-6,0
Cepa ID 28	Control		CMI		3CMI		C MAX	
0h	5,8	nd	5,8	log reducec	5,8	log reducec	5,8	log reducec
1h	5,8	nd	5,8	0,0	5,7	-0,1	5,6	-0,2
3h	6,6	nd	5,6	-0,2	5,1	-0,8	5,1	-0,7
6h	7,6	nd	4,9	-0,9	4,5	-1,3	4,1	-1,7
24h	8,0	nd	2,0	-3,8	1,4	-4,4	0,5	-5,3
48h	8,0	nd	0,0	-5,8	0,0	-5,8	0,0	-5,8
Cepa ID 79	Control		CMI		3CMI		C MAX	
0h	5,9	nd	5,9	log reducec	5,9	log reducec	5,9	log reducec
1h	6,0	nd	5,9	0,1	5,9	0,0	5,8	0,0
3h	6,7	nd	5,8	-0,1	5,7	-0,1	5,7	-0,2
6h	7,7	nd	5,5	-0,3	5,4	-0,4	4,9	-1,0
24h	8,0	nd	4,1	-1,8	3,4	-2,4	2,7	-3,1
48h	8,0	nd	1,5	-4,4	0,0	-5,9	0,0	-5,9
Cepa ID 118	Control		CMI		3CMI		C MAX	
0h	5,8	nd	5,8	log reducec	5,8	log reducec	5,8	log reducec
1h	5,8	nd	5,8	-0,1	5,7	-0,1	5,8	-0,1
3h	6,4	nd	5,5	-0,3	5,4	-0,4	5,7	-0,2
6h	7,7	nd	5,0	-0,8	5,2	-0,6	5,3	-0,5
24h	8,1	nd	3,2	-2,7	2,2	-3,7	1,4	-4,4
48h	8,0	nd	1,3	-4,5	0,7	-5,2	0,0	-5,9
Cepa ID 49	Control		CMI		3CMI		C MAX	
0h	5,9	nd	5,9	log reducec	5,9	log reducec	5,9	log reducec
1h	5,9	nd	5,9	0,0	5,8	-0,1	5,7	-0,1
3h	6,6	nd	5,6	-0,2	5,3	-0,5	5,4	-0,4
6h	7,3	nd	5,2	-0,6	4,8	-1,1	5,1	-0,8
24h	8,1	nd	2,0	-3,8	1,7	-4,2	1,4	-4,5
48h	8,0	nd	1,6	-4,3	1,2	-4,7	0,5	-5,4
Cepa ID 57	Control		CMI		3CMI		C MAX	
0h	5,8	nd	5,8	log reducec	5,8	log reducec	5,8	log reducec
1h	5,9	nd	5,8	0,0	5,8	-0,1	5,8	0,0
3h	6,4	nd	5,8	-0,1	5,5	-0,3	5,6	-0,2
6h	7,5	nd	5,4	-0,5	5,0	-0,8	5,4	-0,5
24h	8,1	nd	2,3	-3,5	2,0	-3,9	1,8	-4,1
48h	8,0	nd	1,6	-4,2	1,4	-4,5	0,5	-5,4

*nd: no determinado.

En la siguiente tabla queda resumida la reducción logarítmica conjunta de las seis cepas.

Tabla 36. Reducción logarítmica media de las 6 cepas representativas a ambos antibióticos.

Tiempo (h)	1CMI	3CMI	C _{max}
3	-0,16	-0,41	-0,32
6	-0,59	-0,80	-0,81
24	-2,94	-3,44	-4,11
48	-4,49	-5,01	-5,70

En las primeras seis horas no solo no se consigue el efecto sinérgico, sino que ambos antibióticos no actúan de manera bactericida, al contrario que moxifloxacino que se comporta de forma bactericida a concentraciones de 3CMI y C_{max} a las 6 horas.

En las siguientes figuras se muestra de forma gráfica el crecimiento bacteriano con y sin antibióticos a lo largo del tiempo.

Figura 38. Recuento logarítmico de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte de la cepa 60.

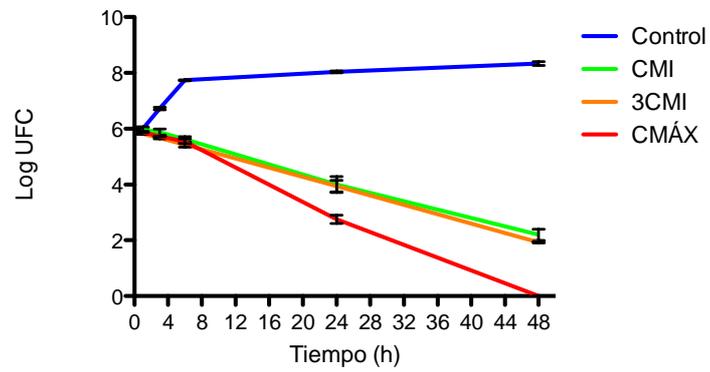


Figura 39. Recuento logarítmico de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte de la cepa 28.

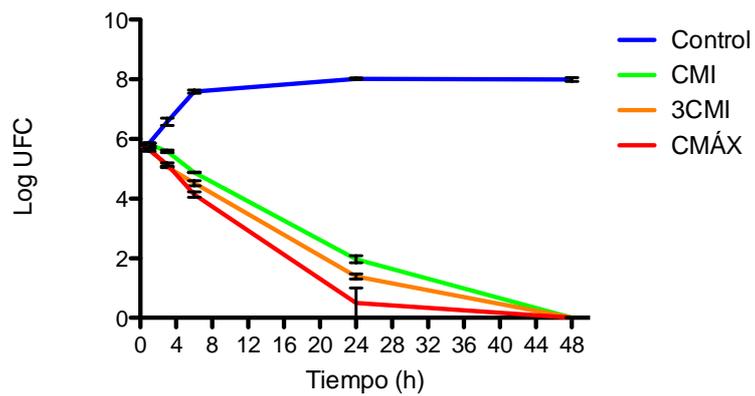


Figura 40. Recuento logarítmico de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte de la cepa 79.

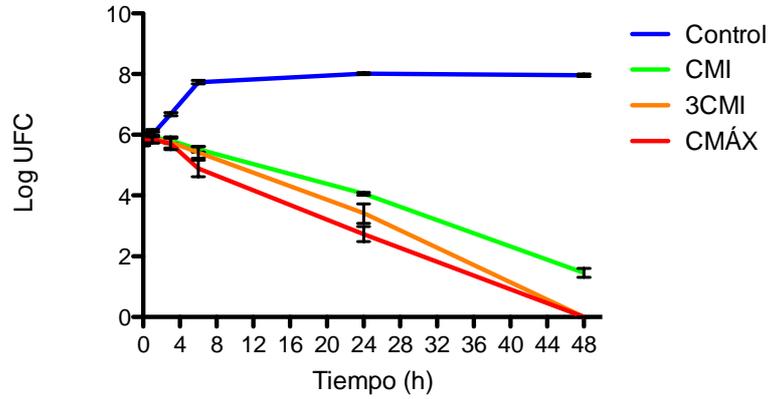


Figura 41. Recuento logarítmico de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte de la cepa 118.

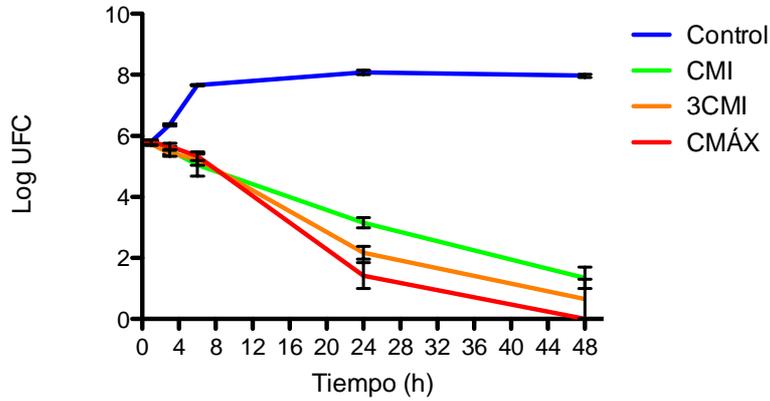


Figura 42. Recuento logarítmico de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte de la cepa 49.

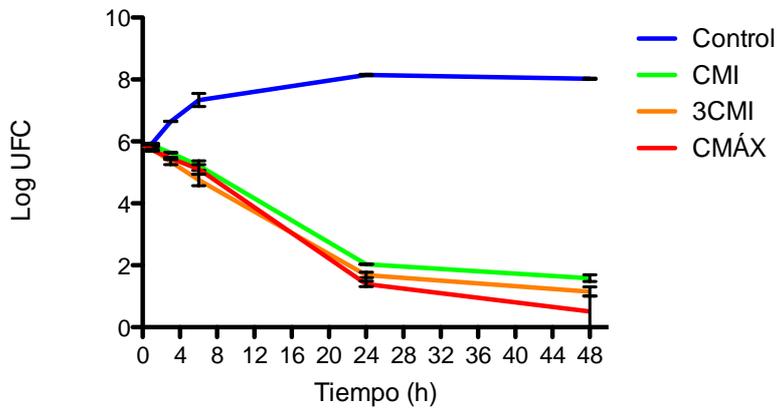
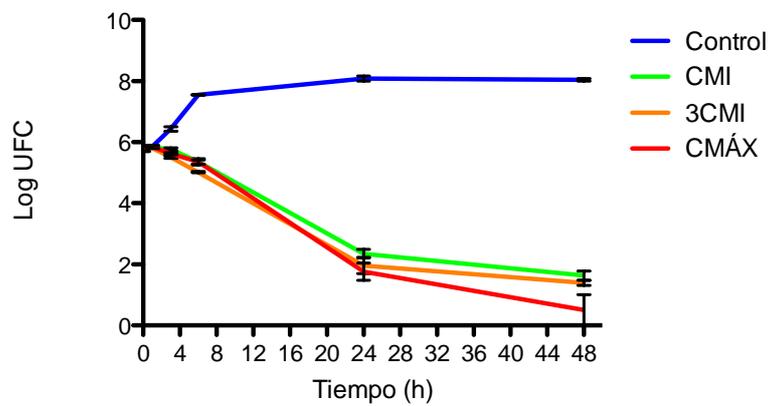


Figura 43. Recuento logarítmico de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte de la cepa 57.



En la tabla 37 se muestra el área bajo la curva (AUKC) de ampicilina más moxifloxacino según la concentración y el tiempo de incubación. Las reducciones del inóculo bacteriano fueron del 33 al 47% a concentraciones de la CMI, del 35 al 53% a 3CMI y del 40 al 60% a C_{max} , no objetivándose sinergia entre ambos antibióticos, en comparación con moxifloxacino solo.

Tabla 37. Área bajo la curva de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte.

Cepa ID 60	Control	CMI	% reducc	3CMI	% reducc	CMAX	% reducc
1h	6,0	6,0	0,0	5,9	0,0	5,9	0,0
3h	18,7	17,8	0,0	17,4	-0,1	17,5	-0,1
6h	40,4	35,1	-0,1	34,0	-0,2	34,4	-0,1
24h	182,3	121,6	-0,3	118,3	-0,4	109,1	-0,4
48h	378,8	195,9	-0,5	188,8	-0,5	142,1	-0,6
Cepa ID 28	Control	CMI	% reducc	3CMI	% reducc	CMAX	% reducc
1h	5,8	5,8	0,0	5,8	0,0	5,7	0,0
3h	18,3	17,2	-0,1	16,5	-0,1	16,5	-0,1
6h	39,5	32,9	-0,2	30,9	-0,2	30,4	-0,2
24h	179,8	94,5	-0,5	84,1	-0,5	72,1	-0,6
48h	371,8	118,0	-0,7	100,7	-0,7	78,1	-0,8
Cepa ID 79	Control	CMI	% reducc	3CMI	% reducc	CMAX	% reducc
1h	5,9	5,9	0,0	5,9	0,0	5,8	0,0
3h	18,6	17,6	-0,1	17,5	-0,1	17,4	-0,1
6h	40,2	34,6	-0,1	34,2	-0,1	33,3	-0,2
24h	181,9	120,8	-0,3	113,6	-0,4	101,8	-0,4
48h	373,7	186,9	-0,5	154,5	-0,6	134,5	-0,6
Cepa ID 118	Control	CMI	% reducc	3CMI	% reducc	CMAX	% reducc
1h	5,8	5,8	0,0	5,8	0,0	5,8	0,0
3h	18,0	17,1	0,0	16,9	-0,1	17,2	0,0
6h	39,0	33,0	-0,2	32,9	-0,2	33,7	-0,1
24h	180,6	106,8	-0,4	99,5	-0,4	94,5	-0,5
48h	373,2	160,8	-0,6	133,3	-0,6	111,6	-0,7
Cepa ID 49	Control	CMI	% reducc	3CMI	% reducc	CMAX	% reducc
1h	5,9	5,9	0,0	5,8	0,0	5,8	0,0
3h	18,5	17,4	-0,1	16,9	-0,1	17,0	-0,1
6h	39,5	33,7	-0,1	32,1	-0,2	32,8	-0,2
24h	178,8	99,0	-0,4	90,1	-0,5	91,1	-0,5
48h	372,7	142,6	-0,6	124,2	-0,7	113,8	-0,7
Cepa ID 57	Control	CMI	% reducc	3CMI	% reducc	CMAX	% reducc
1h	5,8	5,8	0,0	5,8	0,0	5,8	0,0
3h	18,1	17,4	0,0	17,1	-0,1	17,3	0,0
6h	39,1	34,1	-0,1	32,9	-0,2	33,7	-0,1
24h	179,7	103,4	-0,4	95,7	-0,5	97,7	-0,5
48h	373,3	151,1	-0,6	136,0	-0,6	124,8	-0,7

En la tabla 38 queda resumida el área bajo la curva conjunta de las seis cepas.

Tabla 38. Área bajo la curva media de las 6 cepas representativas a ambos antibióticos.

% reducc AUKC	1CMI	3CMI	Cmax
3h	-5%	-7%	-7%
6h	-14%	-17%	-17%
24h	-40%	-45%	-48%
48h	-57%	-63%	-69%

La tasa de muerte definida como la reducción del inóculo inicial a las tres horas de incubación, osciló entre 5-7% en función de la concentración del antibiótico, más parecida a la obtenida con ampicilina que con moxifloxacino. Al igual que los datos obtenidos con el cálculo de la reducción logarítmica, moxifloxacino por separado produce reducciones, en este caso de la AUKC, mucho mayores que la combinación de ambos antibióticos.

En las siguientes figuras se muestra de forma gráfica el área bajo la curva a las diferentes concentraciones y horas.

Figura 44. Área bajo la curva de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte de la cepa 60.

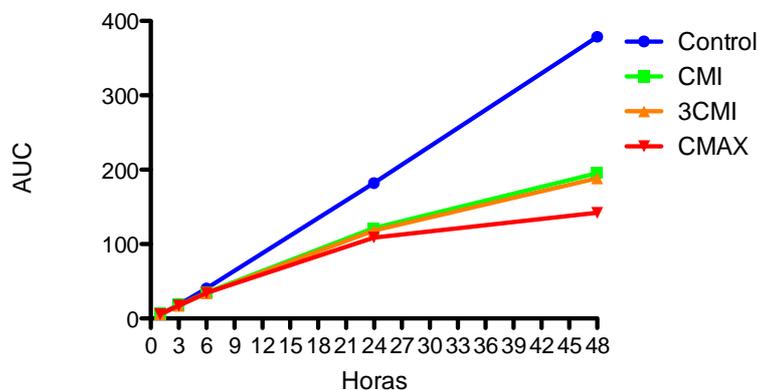


Figura 45. Área bajo la curva de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte de la cepa 28.

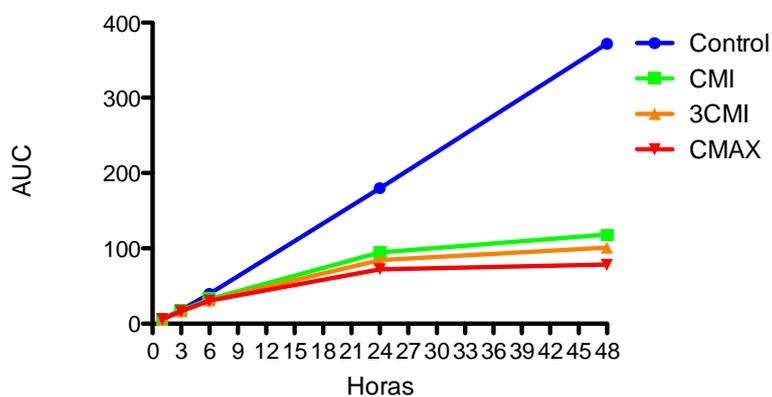


Figura 46. Área bajo la curva de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte de la cepa 79.

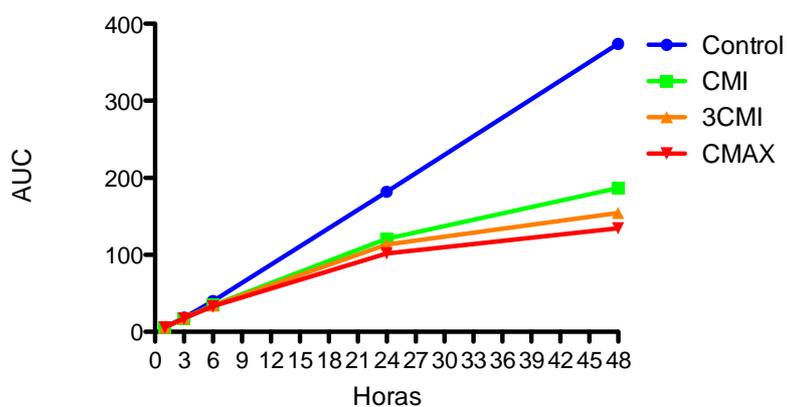


Figura 47. Área bajo la curva de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte de la cepa 118.

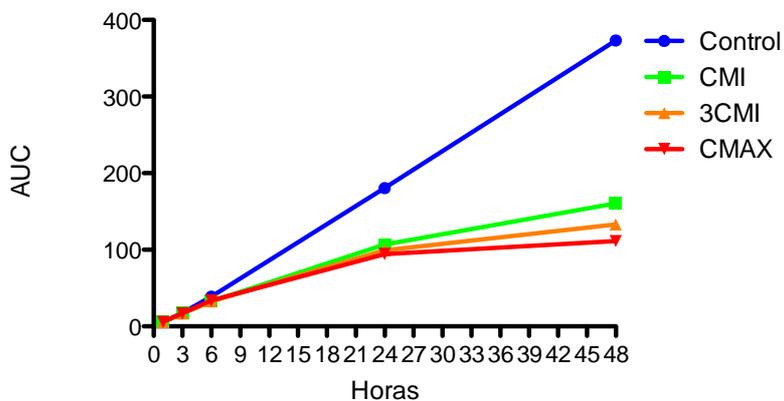


Figura 48. Área bajo la curva de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte de la cepa 49.

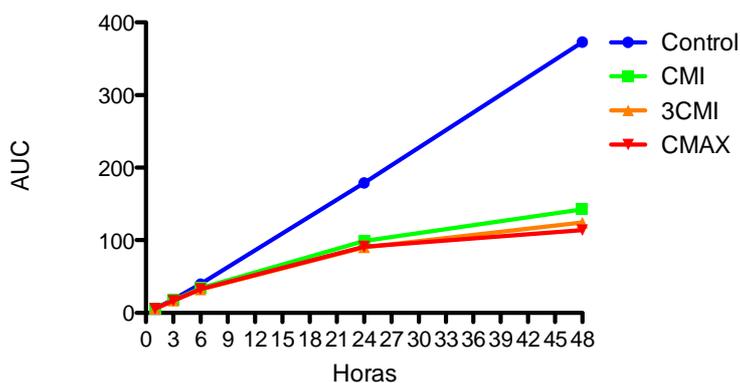
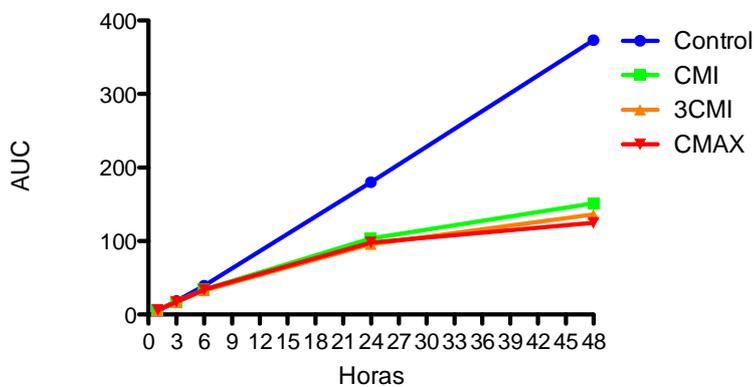


Figura 49. Área bajo la curva de la actividad extracelular de ambos antibióticos mediante curvas de tiempo-muerte de la cepa 57.



5.4 Actividad antimicrobiana intracelular

5.4.1 Moxifloxacino

En la tabla 39 se muestra el crecimiento intracelular de *L. monocytogenes* en el grupo control (sin antibiótico) y en células tratadas con dos concentraciones, 0,5 y 1 C_{max} , de moxifloxacino, mientras que la tabla 40 se recoge el porcentaje de reducción del inóculo inicial a 1 hora en las mismas condiciones experimentales.

Tabla 39. Recuento bacteriano inicial y porcentaje de reducción de la actividad intracelular de moxifloxacin.

CEPA 79				CEPA 118			
MOXIFLOXACINO 1H				MOXIFLOXACINO 1H			
Experimento	SIN ANTIBIOTICO	0.5 CMAX	1 CMAX	Experimento	SIN ANTIBIOTICO	0.5 CMAX	1 CMAX
1	9000	2200	1440	1	4000	1200	1080
2	5000	1960	1240	2	5200	2720	490
3	6000	2400	1160	3	2440	1440	470
mediana	6666,666667	2186,666667	1280	mediana	3880	1786,666667	680
%	100%	33%	19%	%	100%	46%	18%
CEPA 79				CEPA 118			
MOXIFLOXACINO 24H				MOXIFLOXACINO 24H			
Experimento	SIN ANTIBIOTICO	0.5 CMAX	1 CMAX	Experimento	SIN ANTIBIOTICO	0.5 CMAX	1 CMAX
1	32400000	6320	4240	1	85200000	4000	2000
2	26000000	3720	2960	2	140000000	7000	1440
3	15200000	3100	2280	3	150000000	6000	2000
mediana	24533333,33	4380	3160	mediana	125066666,7	5666,66667	1813,333333
%	100%	0,02%	0,01%	%	100%	0,005%	0,001%
CEPA 57				CEPA 60			
MOXIFLOXACINO 1H				MOXIFLOXACINO 1H			
Experimento	SIN ANTIBIOTICO	0.5 CMAX	1 CMAX	Experimento	SIN ANTIBIOTICO	0.5 CMAX	1 CMAX
1	3400000	1600000	564000	1	224000	156000	72000
2	3400000	2200000	612000	2	412000	156000	65000
3	2900000	900000	604000	3	224000	160000	65000
mediana	3233333,333	1566666,67	593333,333	mediana	286666,6667	157333,333	67333,33333
%	100%	48%	18%	%	100%	55%	23%
CEPA 57				CEPA 60			
MOXIFLOXACINO 24H				MOXIFLOXACINO 24H			
Experimento	SIN ANTIBIOTICO	0.5 CMAX	1 CMAX	Experimento	SIN ANTIBIOTICO	0.5 CMAX	1 CMAX
1	140000000	52000	42000	1	48800000	10000	8000
2	180000000	29000	9000	2	81200000	55000	10000
3	150000000	58000	23000	3	48800000	20000	5000
mediana	156666666,7	46333,3333	24666,6667	mediana	59600000	28333,3333	7666,666667
%	100%	0,03%	0,02%	%	100%	0,05%	0,01%
CEPA 28				CEPA 49			
MOXIFLOXACINO 1H				MOXIFLOXACINO 1H			
Experimento	SIN ANTIBIOTICO	0.5 CMAX	1 CMAX	Experimento	SIN ANTIBIOTICO	0.5 CMAX	1 CMAX
1	14000	4000	1280	1	7000	3000	1000
2	19000	8000	6000	2	9000	4000	1500
3	5000	3000	1200	3	6000	3000	1000
mediana	12666,66667	5000	2826,66667	mediana	7333,333333	3333,33333	1166,666667
%	100%	39%	22%	%	100%	45%	16%
CEPA 28				CEPA 49			
MOXIFLOXACINO 24H				MOXIFLOXACINO 24H			
Experimento	SIN ANTIBIOTICO	0.5 CMAX	1 CMAX	Experimento	SIN ANTIBIOTICO	0.5 CMAX	1 CMAX
1	15600000	14000	7000	1	10800000	22000	5600
2	14000000	22000	8000	2	11200000	23000	1320
3	14400000	11000	6000	3	7200000	2000	1120
mediana	14666666,67	15666,67	7000	mediana	9733333,333	15666,6667	2680
%	100%	0,11%	0,05%	%	100%	0,16%	0,03%

Tabla 40. Porcentaje de reducción del recuento bacteriano inicial y tras 1 hora de actividad intracelular de moxifloxacin a dos concentraciones distintas.

Cepas	% de reducción del inóculo	
	0.5 C _{max}	1 C _{max}
Cepa 79	67	81
Cepa 57	52	82

Cepa 28	61	78
Cepa 118	54	82
Cepa 60	45	77
Cepa 49	55	84

Moxifloxacino a concentración de 0,5 C_{max} , logró reducciones del inóculo bacteriano de las distintas cepas a la hora de incubación que variaron del 45% al 67%, y que aumentaron a valores que variaron del 77 al 84% con la concentración 1 C_{max} . Mientras que las 24 horas, se obtuvo una reducción cercana al 100% en todas las cepas estudiadas con las dos concentraciones.

En las siguientes figuras (50-55) se puede ver de forma gráfica la reducción en el crecimiento bacteriano de las diferentes cepas a la hora y a las 24 horas en las células tratadas con moxifloxacino.

Figura 50. Recuento bacteriano de la actividad intracelular de moxifloxacino a la hora y a las 24 horas a diferentes concentraciones de la cepa 79.

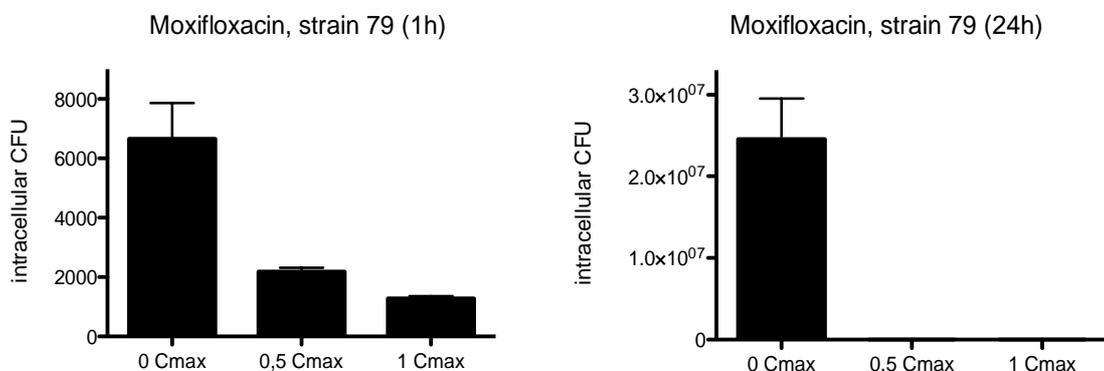


Figura 51. Recuento bacteriano de la actividad intracelular de moxifloxacino a la hora y a las 24 horas a diferentes concentraciones de la cepa 118.

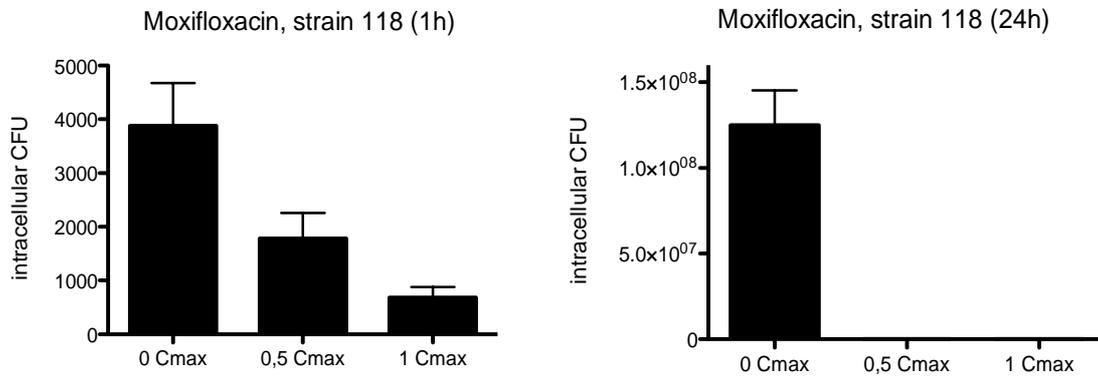


Figura 52. Recuento bacteriano de la actividad intracelular de moxifloxacino a la hora y a las 24 horas a diferentes concentraciones de la cepa 57.

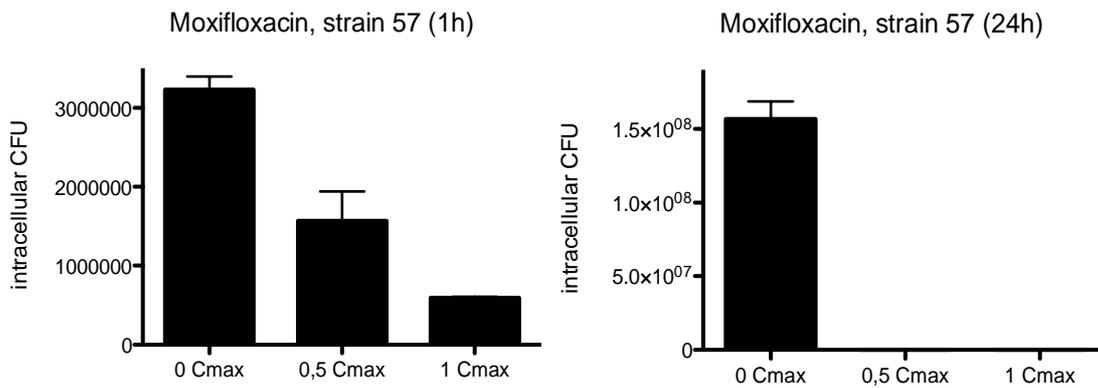


Figura 53. Recuento bacteriano de la actividad intracelular de moxifloxacino a la hora y a las 24 horas a diferentes concentraciones de la cepa 60.

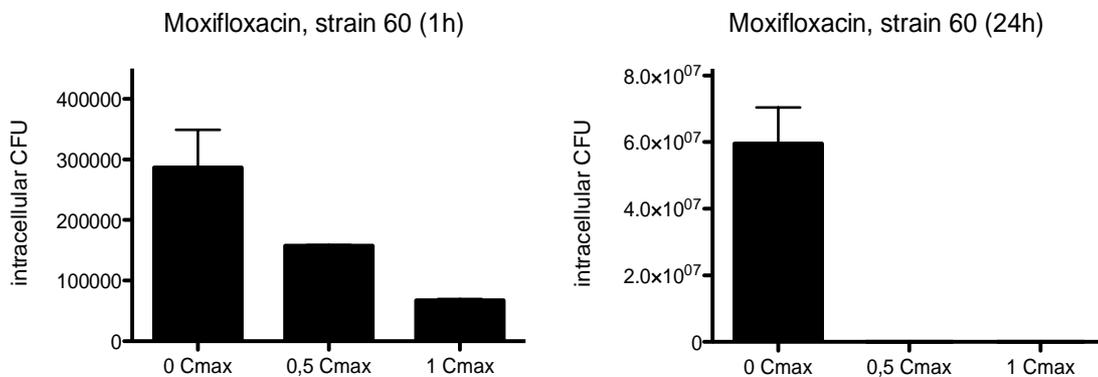


Figura 54. Recuento bacteriano de la actividad intracelular de moxifloxacino a la hora y a las 24 horas a diferentes concentraciones de la cepa 28.

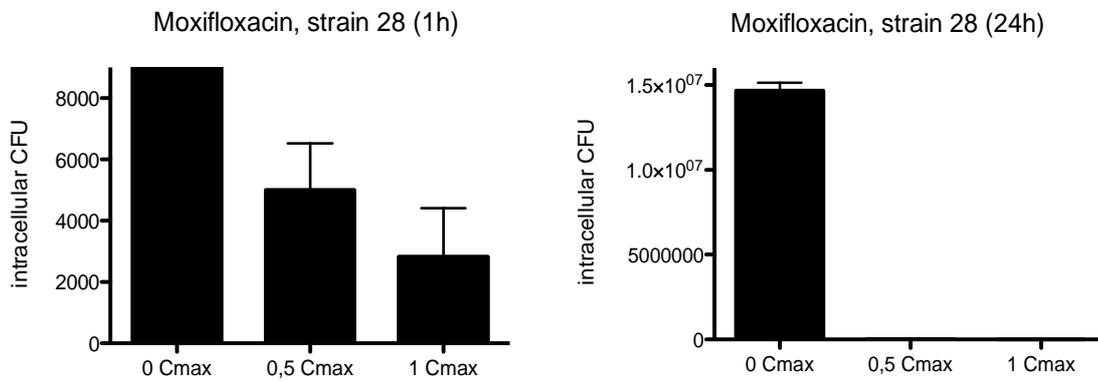
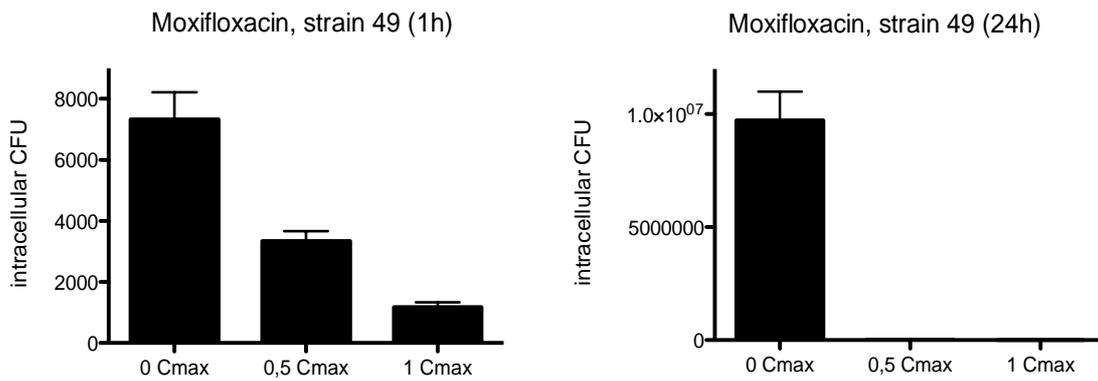


Figura 55. Recuento bacteriano de la actividad intracelular de moxifloxacino a la hora y a las 24 horas a diferentes concentraciones de la cepa 49.



En la siguiente tabla queda recogida la media de reducción en el crecimiento de las seis cepas a la hora y a las 24 horas sobre el inóculo inicial.

Tabla 41. Media de reducción en el crecimiento de las seis cepas tratadas con moxifloxacino.

	0.5 CMAX	1 CMAX
Tiempo	% sobre inóculo inicial	
1h	44%	19%
24h	0,06%	0,02%

5.4.2 Ampicilina

En la tabla 42 se muestra el crecimiento intracelular de *L. monocytogenes* en el grupo control (sin antibiótico) y en células tratadas con dos concentraciones, 0,5 y 1 C_{max}, de ampicilina, mientras que la tabla 43 se recoge el porcentaje de reducción del inóculo inicial a 1 hora en las mismas condiciones experimentales.

Tabla 42. Recuento bacteriano y porcentaje de reducción de la actividad intracelular de ampicilina.

CEPA 79 AMPICILINA 1H			
Experimento	SIN ANTIBIOTICO	0.5 CMAX	1 CMAX
1	9000	2640	5000
2	5000	1920	1800
3	6000	2600	2880
mediana	6666,666667	2386,666667	3226,666667
%	100%	36%	48%

CEPA 79 AMPICILINA 24H			
Experimento	SIN ANTIBIOTICO	0.5 CMAX	1 CMAX
1	32400000	46000	13000
2	26000000	32000	15000
3	15200000	14000	12000
mediana	24533333,33	30666,66667	13333,33333
%	100%	0,13%	0,05%

CEPA 57 AMPICILINA 1H			
Experimento	SIN ANTIBIOTICO	0.5 CMAX	1 CMAX
1	6000	5000	3200
2	13000	22000	12000
3	6000	1640	11000
mediana	8333,333333	9546,666667	8733,333333
%	100%	115%	105%

CEPA 57 AMPICILINA 24H			
Experimento	SIN ANTIBIOTICO	0.5 CMAX	1 CMAX
1	88000000	96000	54000
2	80000000	9000	240000
3	100000000	3000	20000
mediana	89333333,33	36000	104666,6667
%	100%	0,04%	0,12%

CEPA 28 AMPICILINA 1H			
Experimento	SIN ANTIBIOTICO	0.5 CMAX	1 CMAX
1	14000	3000	6000
2	19000	10000	17000
3	5000	5000	12000
mediana	12666,66667	6000	11666,66667
%	100%	47%	92%

CEPA 28 AMPICILINA 24H			
Experimento	SIN ANTIBIOTICO	0.5 CMAX	1 CMAX
1	15600000	184000	47000
2	14000000	144000	20000
3	14400000	5000	4000
mediana	14666666,67	111000	23666,66667
%	100%	0,76%	0,16%

CEPA 118 AMPICILINA 1H			
Experimento	SIN ANTIBIOTICO	0.5 CMAX	1 CMAX
1	62000	32000	17000
2	63000	11000	6000
3	48000	16000	14000
mediana	57666,66667	19666,66667	12333,33333
%	100%	34%	21%

CEPA 118 AMPICILINA 24H			
Experimento	SIN ANTIBIOTICO	0.5 CMAX	1 CMAX
1	85200000	88000	580000
2	140000000	96000	8000
3	150000000	6720	12000
mediana	125066666,7	63573,33333	200000
%	100%	0,05%	0,16%

CEPA 60 AMPICILINA 1H			
Experimento	SIN ANTIBIOTICO	0.5 CMAX	1 CMAX
1	18000	26000	2440
2	4840	40000	32000
3	2280	12000	3600
mediana	8373,333333	26000	12680
%	100%	311%	151%

CEPA 60 AMPICILINA 24H			
Experimento	SIN ANTIBIOTICO	0.5 CMAX	1 CMAX
1	11600000	29000	236000
2	9200000	1400000	8000
3	11200000	6000	10000
mediana	10666666,67	478333,3333	84666,66667
%	100%	4,48%	0,79%

CEPA 49 AMPICILINA 1H			
Experimento	SIN ANTIBIOTICO	0.5 CMAX	1 CMAX
1	7000	5000	3000
2	9000	9000	4000
3	5000	1160	1240
mediana	7000	5053,333333	2746,666667
%	100%	72%	39%

CEPA 49 AMPICILINA 24H			
Experimento	SIN ANTIBIOTICO	0.5 CMAX	1 CMAX
1	10800000	100000	15000
2	11200000	200000	4000
3	7200000	3400	1780
mediana	9733333,333	101133,3333	6926,666667
%	100%	1,04%	0,07%

Tabla 43. Porcentaje de reducción del recuento bacteriano inicial y tras 1 hora de actividad intracelular de ampicilina a dos concentraciones distintas.

Cepas	% de reducción del inóculo	
	0.5 C _{max}	1 C _{max}
Cepa 79	64	52
Cepa 57	-15	-5
Cepa 28	53	8
Cepa 118	66	79
Cepa 60	-211	-51
Cepa 49	28	61

Ampicilina a concentración de $0,5 C_{max}$, logró reducciones del inóculo bacteriano en cuatro de las seis cepas a la hora de incubación que variaron del 28% al 66%, y que aumentaron a valores que variaron del 61 al 79% con la concentración $1 C_{max}$. Mientras que las 24 horas, se obtuvo una reducción cercana al 100% en dichas cepas estudiadas con las dos concentraciones. Sin embargo, en dos cepas no se logró reducción del inóculo inicial a la hora de incubación con la concentración $0,5 C_{max}$ sino que éste se incrementó en un 15% y 111% y con la concentración $1 C_{max}$ estos valores fueron del 5% y 51%. En una de las dos cepas se obtuvo una reducción cercana al 100% a las 24 horas con las dos concentraciones, mientras que en la otra sólo se alcanzó esa reducción con la concentración $1 C_{max}$, siendo la reducción del 95% a la concentración $0,5 C_{max}$.

En las siguientes figuras (56-61) se puede ver de forma gráfica la reducción en el crecimiento bacteriano de las diferentes cepas a la hora y a las 24 horas en las células tratadas con ampicilina.

Figura 56. Recuento bacteriano de la actividad intracelular de ampicilina a la hora y a las 24 horas a diferentes concentraciones de la cepa 79.

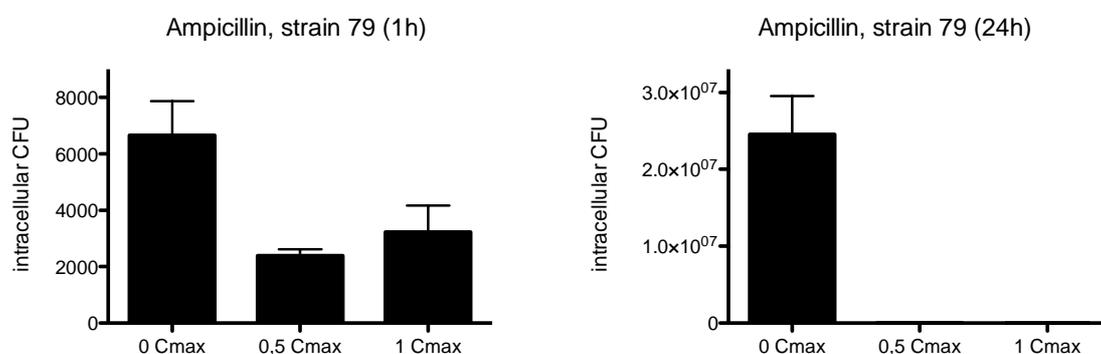


Figura 57. Recuento bacteriano de la actividad intracelular de ampicilina a la hora y a las 24 horas a diferentes concentraciones de la cepa 118.

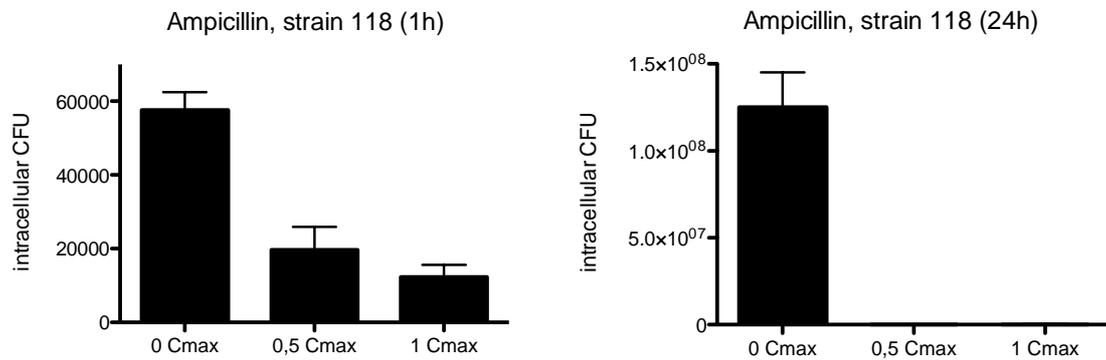


Figura 58. Recuento bacteriano de la actividad intracelular de ampicilina a la hora y a las 24 horas a diferentes concentraciones de la cepa 57.

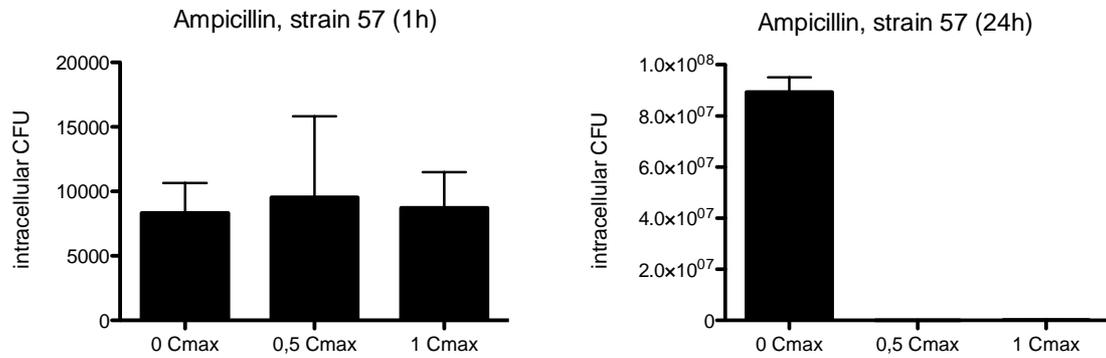


Figura 59. Recuento bacteriano de la actividad intracelular de ampicilina a la hora y a las 24 horas a diferentes concentraciones de la cepa 60.

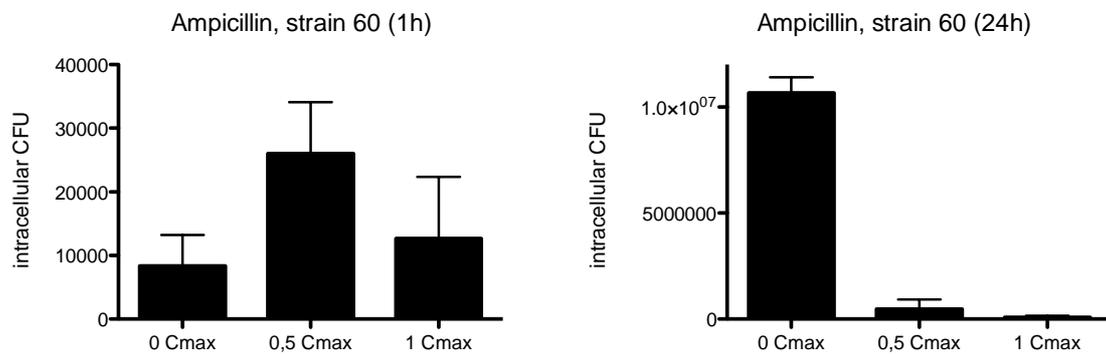


Figura 60. Recuento bacteriano de la actividad intracelular de ampicilina a la hora y a las 24 horas a diferentes concentraciones de la cepa 28.

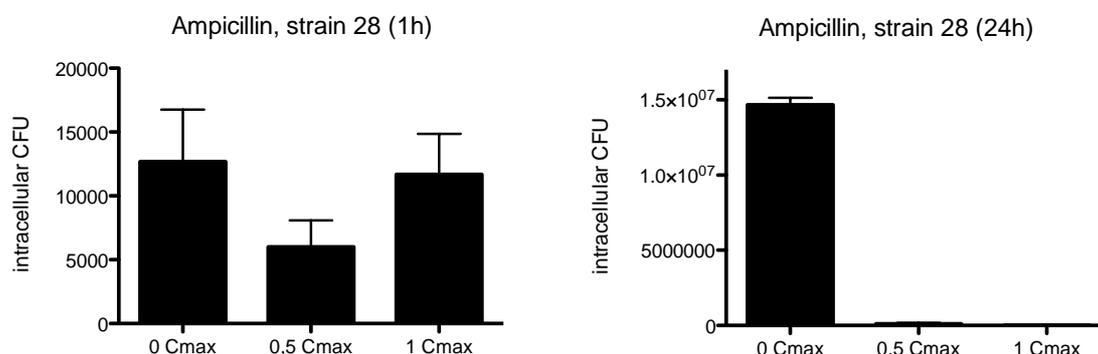
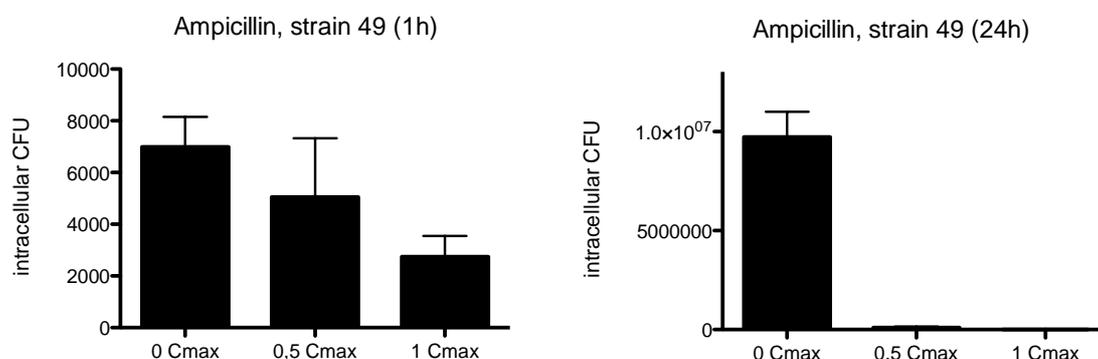


Figura 61. Recuento bacteriano de la actividad intracelular de ampicilina a la hora y a las 24 horas a diferentes concentraciones de la cepa 49.



En la siguiente tabla queda recogida la media de reducción en el crecimiento de las seis cepas sobre el inóculo inicial, a la hora y a las 24 horas de incubación.

Ampicilina al igual que moxifloxacino, logra importantes reducciones del inóculo a las 24 horas de incubación, sin embargo, moxifloxacino llega a ser más rápidamente bactericida, logrando reducciones mucho mayores del inóculo bacteriano en la primera hora.

Tabla 44. Media de reducción en el crecimiento de las seis cepas tratadas con ampicilina.

	0.5 CMAX	1 CMAX
Tiempo	% sobre inóculo inicial	
1h	102%	76%
24h	1,1%	0,2%

DISCUSIÓN

6 Discusión

Aunque EUCAST no proporciona puntos de corte clínicos ni epidemiológicos de moxifloxacino para *L. monocytogenes*, sí proporciona la distribución de valores de CMI en una amplia serie de aislados clínicos. Los valores de CMI_{50/90} de nuestros aislamientos (0,25 y 0,5 mg/L) son una dilución menor que los comunicados por EUCAST (0,5 y 1 mg/L, respectivamente), aspecto que puede ser atribuido a la inherente variabilidad de la técnica de microdilución (65 bis).

Sólo hay un trabajo, publicado por Grayo et al. (43), donde se estudia la distribución de los valores de CMI a moxifloxacino en una serie amplia de aislamientos de distinta procedencia (humana, alimentos y ambientales), determinada mediante tiras de gradiente antibiótico, y donde encuentran una CMI₅₀ de 0,5 mg/L y una CMI₉₀ de 0,75 mg/L, valores más cercanos a los descritos en nuestra serie, pero con distinta metodología a la empleada por nosotros. En otros dos trabajos más publicados, pero con un bajo número de aislamientos estudiados, en el primero que incluye a 26 aislados, encontraron valores de CMI_{50/90} de 0,5 mg/L (66) y en el segundo, con solo 10 aislados, obtuvieron unos valores muy bajos de CMI_{50/90} de 0,03 y 0,12 mg/L (67).

En el caso de ampicilina, todos nuestros aislamientos son sensibles (CMI_{50/90} de 0,25/0,5 mg/L, rango: 0,125-0,5 mg/L) según los criterios de sensibilidad basados en los puntos de corte tanto de EUCAST (≤ 1 mg/L)

como de CLSI (≤ 2 mg/L), resultados que coinciden con lo publicado por otros trabajos en Europa en los últimos años (20, 68, 69, 70), donde se constata que todos los aislamientos de *L. monocytogenes* presentan valores de CMI₉₀ por debajo del ECOFF ≤ 2 mg/L propuesto por EUCAST para diferenciar aquellas poblaciones de *L. monocytogenes* que poseen algún mecanismo de resistencia a ampicilina.

Sin embargo, en 2014, en un estudio realizado en Suiza (71), con un gran número de aislados de *L. monocytogenes* de distinta procedencia tanto humanos como veterinarios y ambientales, se comprueba la existencia de cepas con CMI a ampicilina de 2 mg/L en muestras procedentes de peces, aunque en el estudio molecular no se evidenció la existencia de los genes que confieren resistencia a betalactámicos (*bla1*, *bla2*, *blaZ*). Esta circunstancia también la pone en evidencia Morvan et al. (20), en un gran estudio realizado en Francia que incluía aislamientos clínicos desde 1926 a 2007, donde se observaba, a partir de 1989, la existencia de cepas con valores de CMI de 2 mg/L. Este fenómeno, ya observado anteriormente en aislados ambientales y procedentes de alimentos (72, 73), y carentes de genes que codifiquen betalactamasas, se podría explicar mediante un fenómeno de "MIC creeping" o el aumento progresivo de los valores de CMI a lo largo del tiempo (74), debido al incremento en el uso de betalactámicos desde la segunda mitad del siglo XX, fenómeno ya descrito en *S. pneumoniae* (75).

Aunque no se han publicado fallos clínicos asociados a casos de resistencia a betalactámicos, estudios recientes demuestran que la mutación

de los genes lmo0441 y lmo2229 que codifican la proteína PBP4 en *L. monocytogenes* podrían contribuir al aumento de la CMI a betalactámicos (76).

Moxifloxacino mostró una gran actividad bactericida con valores modales de $CMB_{50/90}$ de 0,5 mg/L para ambos valores, y un cociente $CMB/CMI \leq 4$, por lo que se puede considerar bactericida al presentar un cociente CMB/CMI bajo. En nuestro estudio, la capacidad bactericida de ampicilina es escasa, con cociente $CMB/CMI \geq 16$ y valores de $CMB_{50/90} \geq 8$ mg/L, que coinciden con el trabajo clásico de Moellering et al. de los años 70 del siglo pasado (77), donde ya describían valores de $CMB \geq 16$ en una larga serie de aislamientos invasivos de *L. monocytogenes*. Otros trabajos de esa época (70, 78), comunicaban resultados similares, informando cocientes CMB/CMI inferiores a valores de 32, por lo que en principio descartaban fenómenos de tolerancia a ampicilina. Si la CMB fuera considerablemente mayor que la CMI (cociente mayor de 32), la cepa podría ser considerada como tolerante al antibiótico. En la actualidad no existen datos recientes sobre la actividad bactericida de ampicilina sobre *L. monocytogenes*.

En vista de lo anterior, vemos que nuestros aislamientos se comportan de manera similar, desde el punto de vista de la sensibilidad a ampicilina, a las series publicadas en otros trabajos, aunque no se detectan aislamientos con valores ≥ 1 mg/L como los descritos en algunas series, hecho que podría ser debido a aspectos metodológicos, ya que en algunas de las

series publicadas emplean tiras de gradiente de CMI en vez de la microdilución (técnica de referencia) como metodología de estudio.

En relación a la existencia o no de diferencias significativas entre los distintos serotipos, pulsotipos y clones epidémicos, en nuestro estudio llegamos a la conclusión que todas las cepas se comportan de la misma forma con leves diferencias, ante los dos antimicrobianos estudiados.

Debido a la limitada experiencia y a la dificultad de realizar estudios clínicos con moxifloxacino a nivel del SNC en humanos, se realizó una simulación de Monte Carlo para evaluar su actividad a nivel de SNC. Esta simulación, nos ha permitido estimar las concentraciones de moxifloxacino y ampicilina que se pueden alcanzar en LCR con las dosis propuestas para el tratamiento de la infección por *L. monocytogenes*.

En nuestro estudio, la simulación predice concentraciones máximas medias de moxifloxacino en LCR de 1,14 mg/L y de 2,28 mg/L con dosis de 400 y 800 mg/día, respectivamente y de ampicilina de 24,5 y 49 mg/L a dosis de 200 y 400 mg/Kg/día. Estos últimos valores, coinciden con los obtenidos en estudios experimentales, donde los niveles oscilan entre 0,3-38 mg/L, con un porcentaje de penetración que varía entre el 4-65% en función de la dosis utilizada (79).

Al aplicar dichas concentraciones, el modelo predijo una probabilidad del 85% de éxito terapéutico con dosis de 400 mg/día y del 99,2% con dosis de 800 mg/día de moxifloxacino, resultados ampliamente superiores a los que se obtienen comparativamente con ampicilina, 4% de éxito con dosis de

200 mg/Kg/día, y que al aumentar la dosis a 400 mg/Kg/día se incrementa hasta un 25%, muy lejos del objetivo terapéutico, $C_{\max, \text{libre}}/\text{CMB} \geq 10$ ($\geq 90\%$).

Asimismo, con dosis de 400 mg/día de moxifloxacino y teniendo en cuenta los puntos de corte PK/PD derivados del modelo, serían sensibles el 73% de las cepas y el 100% si empleáramos dosis de 800 mg/día. Estos resultados concuerdan con lo publicado por Kanellakopoulou et al., donde demuestran que moxifloxacino es altamente bactericida a nivel del SNC (41).

En base a estos resultados *in vitro*, moxifloxacino podría estar cualificado para reemplazar a ampicilina como tratamiento de primera elección de la listeriosis. Además, distintos trabajos (44, 46, 80) en modelos animales demuestran que es capaz de reducir la carga bacteriana de la infección, incluyendo animales inmunodeprimidos. Puesto que no existe experiencia clínica, no se puede hacer una recomendación generalizada para el uso de moxifloxacino en el tratamiento en humanos, pero un caso clínico publicado de tratamiento con levofloxacino en un paciente con meningitis también avala estos resultados, a pesar de que las características farmacocinéticas de este antibiótico son inferiores a las de moxifloxacino (81).

Respecto al punto de corte PK/PD de moxifloxacino en LCR: $\leq 0,25$ mg/L con dosis de 400 mg/día y 0,5 mg/L con dosis de 800 mg/día, a pesar de no existir punto de corte propuesto por EUCAST ni CLSI, si justificaría el empleo de dosis máxima en el tratamiento de la infección en SNC.

En nuestro estudio, la simulación predice concentraciones máximas medias de ampicilina en LCR de 24,5 y 49 mg/L con dosis de 200 y 400 mg/Kg/día, y aunque en general, los betalactámicos penetran mal a través de la barrera hematoencefálica, sin embargo, las formas ionizadas, caso de ampicilina, penetran relativamente bien en LCR. Estos valores están en línea con estudios experimentales publicados, donde los niveles oscilan entre 0,3-38 mg/L, con un porcentaje de penetración que varía entre el 4-65% en función de la dosis utilizada (79).

La actividad de los betalactámicos en LCR es concentración dependiente, a diferencia de lo que ocurre con las infecciones que se producen en otras partes del cuerpo (82). Esta conclusión deriva de estudios experimentales, donde se demuestra que la muerte bacteriana aumenta a medida que se incrementa la concentración máxima en LCR, obteniéndose la máxima actividad cuando la concentración supera la CMB en al menos 10 veces (62). Sin embargo, la concentración máxima y el T>CMB de los antibióticos están correlacionados y cuando la concentración del antibiótico supera en al menos 10 veces la CMB, el T>CMB en LCR se consigue durante todo el período entre dosis (63), haciéndose los dos conceptos equivalentes a nivel del SNC.

En la simulación realizada, el objetivo terapéutico de $C_{\max, \text{libre}}/\text{CMB} \geq 10$, solo se consiguió con ampicilina en el 4% y 25% de los casos, y por tanto sólo sería eficaz la dosis de 200 mg/Kg/día en el 2% de nuestras cepas, aquellas con valores de $\text{CMB} \leq 2$ mg/L, y con dosis de 400 mg/Kg/día en el

15%, aquellas con valores de CMB de 4 mg/L. Los resultados anteriores, demuestran que concentraciones bacteriostáticas de ampicilina en LCR (concentraciones máximas entre la CMI y la CMB) producen una disminución lenta de los recuentos bacterianos y esto afecta a la respuesta al tratamiento. El clásico parámetro PK/PD $C_{\max}/CMI > 10$, produce una supresión persistente del crecimiento bacteriano, efecto insuficiente en una infección del SNC, donde los mecanismos de defensa del hospedador están disminuidos y justificaría el empleo de parámetros PK/PD que incluyan la CMB (C_{\max}/CMB). Estos resultados, podrían explicar posibles fallos en el tratamiento de la infección por *L. monocytogenes* a nivel del SNC y justificaría las recaídas y fracasos en el tratamiento publicados en personas con meningitis (83), de hecho, el tratamiento antibiótico óptimo para la listeriosis no se ha establecido en ensayos clínicos controlados.

Aun así, ampicilina, aunque se considera bacteriostático frente a *L. monocytogenes*, puede producir actividad bactericida retardada *in vitro* (48 horas) a niveles que se pueden obtener en el LCR (84). Lo anterior se puede atribuir al hecho de que es un microorganismo de crecimiento lento (85). Nuestro estudio predice dicha actividad bactericida, aunque leve a las 24 horas, que puede llegar al 25% de los casos con dosis de 400 mg/Kg/día y podría añadir una actividad adicional que justificaría la inclusión de este antibiótico en el tratamiento de la infección del SNC (33).

Respecto a la comparación del punto de corte de moxifloxacino proporcionado por la simulación: $CMB \leq 2$ mg/L con dosis de 400 mg/día y

CMB ≤ 4 mg/L con dosis de 800 mg/día, respecto a los propuestos por CLSI y EUCAST: CMI ≤ 2 mg/L y ≤ 1 mg/L respectivamente, es de difícil valoración, ya que nosotros proponemos un punto de corte basado en CMB, para adecuarlo al objetivo PK/PD propuesto para infección del SNC, mientras que CLSI y EUCAST proponen puntos de corte a nivel general basados en la CMI y de difícil extrapolación al SNC. Sin embargo, pensamos que son similares si utilizamos la dosis de 400 mg/día, e incluso por las propiedades bactericidas y farmacocinéticas del fármaco, con la dosis de 800 mg/día este valor podría ascender a 4 mg/L.

Existen pocos estudios que evalúen la actividad de moxifloxacino mediante curvas de tiempo-muerte en *L. monocytogenes*. Grayo et al. (43), demuestran empleando una cepa serotipo 1/2a virulenta y productora de hemolisina, que el inóculo inicial se reduce en más de 3 log UFC/mL después de 6 horas de incubación, con una tasa de muerte bacteriana alta a concentraciones de 4xCMI y de C_{max} , aspecto que coincide con nuestros resultados, donde con concentraciones 3xCMI y C_{max} la reducción media del inóculo osciló entre 2,9 y 3,1 log. En otro trabajo de Carryn et al. (42), también demuestran una alta actividad bactericida de moxifloxacino a las 24 horas de incubación a concentraciones clínicamente relevantes (4 mg/L). Seral et al. (45), también encuentran resultados similares, con reducciones del orden de 2 log a las 5 horas de incubación a concentraciones de moxifloxacino de 3,4 mg/L.

Por tanto, todos los estudios realizados con esta metodología, incluido el nuestro, demuestran la actividad bactericida de moxifloxacino.

En el caso de ampicilina, los valores de CMI y CMB encontrados en el estudio extracelular revelan una actividad bacteriostática, con cocientes $CMB_{90}/CMI_{90} \geq 32$. Sin embargo, estos datos contradicen la experiencia clínica donde la ampicilina y penicilina son efectivas en el tratamiento de la meningitis por *L. monocytogenes* (86,87).

Esta posible contradicción, fue evaluada por Appleman et al. (85), demostrando que la prolongación de la incubación genera un efecto bactericida de ampicilina sobre *L. monocytogenes*, similar a lo que estaba descrito anteriormente en *S. aureus* (88). Es decir, el efecto bactericida de los antibióticos betalactámicos en *L. monocytogenes*, demostrado por curvas tiempo-muerte ocurre entre las 24 y las 48 horas de incubación (85). Por lo tanto, se puede afirmar que la eficacia clínica en meningitis de los betalactámicos es gracias a la actividad bactericida a las 24-48 horas tras un tratamiento prolongado.

La explicación de este fenómeno se debe a la baja tasa de crecimiento de este microorganismo, que requiere 48 horas para alcanzar un conteo de 10^8 - 10^{10} UFC/mL, a diferencia de otras bacterias como *Staphylococcus spp.* que consiguen estos conteos en 24 horas (89, 90). Por esta razón, en el tiempo de exposición al antibiótico, la tasa de muerte bacteriana superaría a la tasa de crecimiento de las bacterias.

Por todo ello, nuestros resultados demuestran la actividad bactericida que predice el modelo clínico de simulación de Monte Carlo y están en consonancia con los resultados clínicos publicados.

Aunque ambos antibióticos ejercen un efecto bactericida sobre las formas extracelulares de *L. monocytogenes*, moxifloxacino actúa más rápidamente que ampicilina (42, 43). Esta rápida actividad bactericida podría afectar de forma favorable a la adecuada evolución clínica de los pacientes, especialmente en aquellos con déficit de la inmunidad celular (91).

A lo anterior, habría que añadir, que dado que la barrera hematoencefálica limita la entrada de antibióticos en el SNC (82) y moxifloxacino alcanza altas concentraciones en LCR en comparación con ampicilina, incrementándose su coeficiente terapéutico, esto podría ser una ventaja adicional a la hora del tratamiento de la infección por *L. monocytogenes* a dicho nivel (41).

Existen muy pocas publicaciones que valoren la sinergia entre betalactámicos y quinolonas frente a *L. monocytogenes*, pero en dos trabajos publicados demuestran la existencia de antagonismo de las combinaciones tanto *in vitro* como en un modelo de ratón neutropénico (92, 93), aunque ninguno de los trabajos incluye moxifloxacino en el estudio. En nuestro estudio, con la combinación de tres concentraciones fijas de ambos antibióticos, no se detectó efecto sinérgico (reducción del inóculo inicial de al

menos 2 log comparándolo con el antibiótico más activo) con ninguna de las combinaciones estudiadas, pero sí indiferencia, ya que en ninguna de ellas se produjo tal disminución del inóculo inicial y la actividad fue similar a la del antibiótico más activo, en este caso, moxifloxacino.

La entrada de las quinolonas en células eucariotas tiene lugar por difusión pasiva, dada la naturaleza anfifílica de estos antibióticos. En ciprofloxacino, no obstante, se han descrito mecanismos de expulsión celular activa mediante bombas de flujo, fenómeno que no ocurre con moxifloxacino (94).

El análisis conjunto de los resultados demuestra la gran actividad intracelular de moxifloxacino que logró reducciones del inóculo bacteriano a la hora de incubación entre el 56-81% dependiendo de la concentración de antibiótico empleada, llegando a la esterilización del nicho intracelular a las 24 horas, con reducciones del 99,97-99,99% a concentraciones de 0,5xCMI y C_{max}.

Estos resultados, están en consonancia con otros trabajos que demuestran que moxifloxacino presenta una rápida acción bactericida concentración dependiente frente a las formas intracelulares de *L. monocytogenes* (42, 43, 80).

Ampicilina, aunque produce reducciones del inóculo intracelular muy modestas a 1 hora de incubación (0-25%) a concentraciones de 0,5xCMI y

C_{max} ; a las 24 horas, la reducción es muy importante (98,9 y 99,8%) a las mismas concentraciones.

Los betalactámicos, al menos en su forma ionizada, caso de la ampicilina, reaccionan como ácidos débiles y son capaces de difundir de forma lenta a través de la membrana celular acumulándose en el citosol (95). Esto podría explicar, la gran diferencia que existe entre la actividad intracelular a la hora de incubación y a las 24 horas.

Además, a pesar de estas bajas concentraciones intracelulares, algunos autores han demostrado que la eficacia de ampicilina es superior que la conseguida a nivel extracelular sobre todo a las 24 horas (31, 42). Este aspecto, también ha sido objetivado en nuestro trabajo, donde la actividad de ampicilina mediante curvas tiempo-muerte a las 24 horas produjo reducciones del inóculo inicial utilizando el parámetro de AUKC del 32-33% a concentraciones $3 \times CMI$ y C_{max} , frente a reducciones cercanas al 99% a nivel intracelular. Lo anterior podría ser explicado por otros procesos, que también contribuyen a este marcado efecto de ampicilina a las 24 horas, como es la inducción de la muerte celular y por tanto la eliminación del nicho intracelular. La pyroptosis (una forma de muerte celular), se desencadena cuando las formas intracelulares de *L. monocytogenes* son lisadas por ampicilina (96).

La comparación de la actividad de ambos antibióticos demuestra que, aunque la actividad a las 24 horas fue similar con reducciones del inóculo

intracelular cercanas al 100%, moxifloxacino ejerce su actividad intracelular de forma más rápida a 1 hora de incubación, con reducciones entre 4 y 50 veces más altas, según concentración, que ampicilina.

Esta conclusión, está apoyada por los resultados en modelos animales, en los que se ha evaluado la actividad a nivel de distintos órganos donde *L. monocytogenes* reside principalmente dentro de las células, demostrándose que la actividad de moxifloxacino fue superior a la de ampicilina (36). También, en modelos experimentales de meningitis, que se asemejan más a las condiciones definidas en nuestro trabajo, moxifloxacino fue altamente efectivo (44, 46).

Los resultados de este trabajo demuestran la rápida actividad bactericida de moxifloxacino contra las formas extracelulares e intracelulares de *L. monocytogenes* a nivel de SNC respecto al tratamiento actual con ampicilina y gentamicina. Por tanto, moxifloxacino constituye una alternativa prometedora para el tratamiento de la neurolisteriosis. Sin embargo, debido a que la actividad *in vitro* e *in silico* no siempre predicen la eficacia *in vivo*, estos resultados deberán que ser contrastados mediante estudios previos en modelos animales adecuados y estudios clínicos.

CONCLUSIONES

7 Conclusiones

1. Todas las cepas de *Listeria monocytogenes* fueron sensibles a ampicilina según los criterios EUCAST y CLSI, y a moxifloxacino según el punto de corte determinado mediante simulación de Monte Carlo en nuestro estudio, basado en la CMB y que presentan un valor ligeramente más elevado.
2. No encontramos diferencias en la actividad de los dos antimicrobianos estudiados entre los distintos serotipos, pulsotipos y clones epidémicos de *L. monocytogenes*, comportándose todas las cepas de forma uniforme.
3. Moxifloxacino con dosis de 400 y 800 mg/día, consigue el objetivo terapéutico en el 85 y 99% de las simulaciones, respectivamente. Sin embargo, ampicilina con dosis máxima, tan solo alcanza el objetivo terapéutico en LCR en el 25% de las simulaciones por el modelo de Monte Carlo.
4. En el estudio extracelular mediante curvas de muerte, moxifloxacino se comporta de manera bactericida a las 6 horas de incubación a concentraciones de 3CMI y C_{\max} con elevadas reducciones del inoculo inicial, mientras que ampicilina se comporta de forma bacteriostática con independencia de la concentración utilizada, alcanzándose solo actividad bactericida a las 48 horas de incubación.
5. No se detectó efecto sinérgico entre ambos antibióticos con ninguna de las combinaciones estudiadas, siendo la actividad conjunta de estos

fármacos, similar a la de moxifloxacino, hecho este que limitaría el uso clínico de esta asociación.

6. Moxifloxacino demostró una gran actividad bactericida intracelularmente, con reducciones del inóculo inicial entre el 56 y el 81% a la hora de incubación, y esterilizando el cultivo a las 24 horas.
7. Al igual que moxifloxacino, ampicilina logra esterilizar el medio a las 24 horas de incubación, aunque solo logra reducciones del 0 al 25% en la primera hora.
8. Finalmente moxifloxacino puede ser una buena alternativa al tratamiento actual de la infección del SNC por *L. monocytogenes*, dada su gran actividad bactericida tanto extra como intracelularmente y su buena penetración en líquido cefalorraquídeo.

BIBLIOGRAFÍA

8 Bibliografía

1. De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA et al. BERGEY'S MANUAL® OF Systematic Bacteriology. Vol. 3. 2ª ed. Nueva York: Springer; 2009.
2. Sauders B, Wiedmann M. Ecology of *Listeria* Species and *L. monocytogenes* in the Natural Environment. En: Ryser ET, Marth EH, editores. *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety. 3ª ed. Boca Ratón: CRC Press; 2007. p. 21-53.
- 2 bis. den Bakker HC, Warchocki S, Wright EM, Allred AF, Ahlstrom C, Manuel CS et al. *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatic* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. Int J Syst Evol Microbiol. 2014; 64(6): 1882-9.
3. Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W et al. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. Clin Microbiol Rev. 2001; 14(3): 584-640.
4. Guillet C, Join-Lambert O, Le Monnier A, Leclercq A, Mechaï F, Mamzer-Bruneel MF et al. Human Listeriosis Caused by *Listeria ivanovii*. Emerg Infect Dis. 2010; 16(1): 136-8.
5. Drevets DA, Leenen PJ, Greenfield RA. Invasion of the Central Nervous System by Intracellular Bacteria. Clin Microbiol Rev. 2004; 17(2): 323-47.

6. Oevermann A, Zurbriggen A, Vandeveld M. Rhombencephalitis Caused by *Listeria monocytogenes* in Humans and Ruminants: A Zoonosis on the Rise? *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2010; 2010: 632513.
7. Denny J, McLauchlin J. Human *Listeria monocytogenes* infections in Europe - an opportunity for improved European surveillance. *Eurosurveillance.* 2008; 13(1-3). pii: 8082.
8. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (2013). Scientific Report of EFSA and ECDC. *EFSA Journal* 2013, 11(4): 3129.
9. Koch J, Stark K. Significant increase of listeriosis in Germany - Epidemiological patterns 2001-2005. *Eurosurveillance.* 2006; 11(6): 85-8.
10. Pentecost M, Kumaran J, Ghosh P, Amieva MR. *Listeria monocytogenes* Internalin B Activates Junctional Endocytosis to Accelerate Intestinal Invasion. *PLoS Pathog.* 2010; 6(5): e1000900.
11. Brouwer MC, van de Beek D, Heckenberg SG, Spanjaard L, de Gans J. Community-Acquired *Listeria monocytogenes* Meningitis in Adults. *Clin Infect Dis.* 2006; 43(10): 1233-8.
12. Thwaites GE, Tran TH. Tuberculous meningitis: many questions, too few answers. *Lancet Neurol.* 2005; 4(3): 160-70.
13. Bartt R. *Listeria* and atypical presentations of *Listeria* in the central nervous system. *Semin Neurol.* 2000; 20(3): 361-73.

14. Antal EA, Dietrichs E, Løberg EM, Melby KK, Maehlen J. Brain stem encephalitis in listeriosis. *Scand J Infect Dis.* 2005; 37(3): 190-4.
15. Eckburg PB, Montoya JG, Vosti KL. Brain abscess due to *Listeria monocytogenes*: five cases and a review of the literature. *Medicine (Baltimore).* 2001; 80(4): 223-35.
16. Lorber B. Listeriosis. *Clin Infect Dis.* 1997; 24(1): 1-11.
17. Disson O, Lecuit M. Targeting of the central nervous system by *Listeria monocytogenes*. *Virulence.* 2012; 3(2): 213-21.
18. Dumont JA, Cotoni L. Bacille semblable au bacille du rouget du porc rencontré dans le liquide céphalo-rachidien d'un méningitique. *Ann Inst Pasteur (Paris).* 1921; 35(10): 625-33.
19. Murray EGD, Webb RA, Swann MBR. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis caused by hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *J Pathol Bact.* 1926; 29: 407-39.
20. Morvan A, Moubareck C, Leclercq A, Hervé-Bazin M, Bremont S, Lecuit M et al. Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Humans in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(6): 2728-31.
21. Hof H. Therapeutic activities of antibiotics in listeriosis. *Infection.* 1991; 19(4): 229-33.

22. Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, Willingham M, Lai SL, Gazdar A et al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer Inst.* 1989; 81(2): 116-24.
23. Hof, H. An update on the medical management of listeriosis. *Expert Opin Pharmacother.* 2004; 5(8): 1727-35.
24. Scheld WM, Fletcher DD, Fink FN, Sande MA. Response to Therapy in an Experimental Rabbit Model of Meningitis Due to *Listeria monocytogenes*. *J Infect Dis.* 1979; 140(3): 287-94.
25. Tunkel AR, Glaser CA, Bloch KC, Sejvar JJ, Marra CM, Roos KL et al. The Management of Encephalitis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2008; 47(3): 303-27.
26. Mylonakis E, Hohmann EL, Calderwood SB. Central nervous system infection with *Listeria monocytogenes*. 33 years' experience at a general hospital and review of 776 episodes from the literature. *Medicine (Baltimore).* 1998; 77(5): 313-36.
27. Winslow DL, Damme J, Dieckman E. Delayed Bactericidal Activity of β -Lactam Antibiotics Against *Listeria monocytogenes*: Antagonism of Chloramphenicol and Rifampin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1983; 23(4): 555-8.
28. Espaze EP, Reynaud AE. Antibiotic susceptibilities of *Listeria*: in vitro studies. *Infection.* 1998; 16 Supl 2: 160-4.

29. Carryn S, Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens P. Comparative Intracellular (THP-1 Macrophage) and Extracellular Activities of β -Lactams, Azithromycin, Gentamicin, and Fluoroquinolones against *Listeria monocytogenes* at Clinically Relevant Concentrations. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(7): 2095-103.
30. Cossart P, Lecuit M. Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *EMBO J.* 1998; 17(14): 3797-806.
31. Michelet C, Avril JL, Cartier F, Berche P. Inhibition of Intracellular Growth of *Listeria monocytogenes* by Antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994; 38(3): 438-46.
32. Siefert HM, Domdey-Bette A, Henninger K, Hucke F, Kohlsdorfer C, Stass H. Pharmacokinetics of the 8-methoxyquinolone, moxifloxacin: a comparison in humans and other mammalian species. *J Antimicrob Chemother.* 1999; 43 Supl B: 69-76.
33. Hof H, Nichterlein T, Kretschmar M. Management of Listeriosis. *Clin Microbiol Rev.* 1997; 10(2): 345-57.
34. Temple ME, Nahata MC. Treatment of listeriosis. *Ann Pharmacother.* 2000; 34(5): 656-61.
35. Michelet C, Avril JL, Arvieux C, Jacquelinet C, Vu N, Cartier F. Comparative Activities of New Fluoroquinolones, Alone or in

- Combination with Amoxicillin, Trimethoprim-Sulfamethoxazole, or Rifampin, against Intracellular *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41(1): 60-5.
36. Safdar A, Armstrong D. Antimicrobial Activities against 84 *Listeria monocytogenes* Isolates from Patients with Systemic Listeriosis at a Comprehensive Cancer Center (1955-1997). *J Clin Microbiol.* 2003; 41(1): 483-5.
37. Michot JM, Seral C, Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Influence of Efflux Transporters on the Accumulation and Efflux of Four Quinolones (Ciprofloxacin, Levofloxacin, Garenoxacin, and Moxifloxacin) in J774 Macrophages. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(6): 2429-37.
38. Carryn S, Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Comparative Intracellular (THP-1 Macrophage) and Extracellular Activities of β -Lactams, Azithromycin, Gentamicin, and Fluoroquinolones against *Listeria monocytogenes* at Clinically Relevant Concentrations. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(7): 2095-103.
39. Godreuil S, Galimand M, Gerbaud G, Jacquet C, Courvalin P. Efflux Pump Lde Is Associated with Fluoroquinolone Resistance in *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(2): 704-8.
40. Alffenaar JW, van Altena R, Bökkerink HJ, Luijckx GJ, van Soolingen D, Aarnoutse RE et al. Pharmacokinetics of Moxifloxacin in

- Cerebrospinal Fluid and Plasma in Patients with Tuberculous Meningitis. Clin Infect Dis. 2009; 49(7): 1080-2.
41. Kanellakopoulou K, Pagoulatou A, Stroumpoulis K, Vafiadou M, Kranidioti H, Giamarellou H et al. Pharmacokinetics of moxifloxacin in non-inflamed cerebrospinal fluid of humans: implication for a bactericidal effect. J Antimicrob Chemother. 2008; 61(6): 1328-31.
42. Carryn S, Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Activity of β -lactams (ampicillin, meropenem), gentamicin, azithromycin and moxifloxacin against intracellular *Listeria monocytogenes* in a 24 h THP-1 human macrophage model. J Antimicrob Chemother. 2003; 51(4): 1051-2.
43. Grayo S, Join-Lambert O, Desroches MC, Le Monnier A. Comparison of the In Vitro Efficacies of Moxifloxacin and Amoxicillin against *Listeria monocytogenes*. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(5): 1697-702.
44. Grayo S, Lott-Desroches MC, Dussurget O, Respaud R, Fontanet A, Join-Lambert O et al. Rapid Eradication of *Listeria monocytogenes* by Moxifloxacin in a Murine Model of Central Nervous System Listeriosis. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(9): 3210-5.
45. Seral C, Barcia-Macay M, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM Van Bambeke F. Comparative activity of quinolones (ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin and garenoxacin) against extracellular and intracellular infection by *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus*

- aureus* in J774 macrophages. J Antimicrob Chemother. 2005; 55(4): 511-7.
46. Sipahi OR, Turhan T, Pullukcu H, Calik S, Tasbakan M, Sipahi H et al. Moxifloxacin versus ampicillin + gentamicin in the therapy of experimental *Listeria monocytogenes* meningitis. J Antimicrob Chemother. 2008; 61(3): 670-3.
47. Lepe JA, Torres MJ, Liró J, Luque R, Aznar J. Grupo LISAND-Microbiología. Caracterización microbiológica de los aislados de *Listeria monocytogenes* procedentes de casos humanos en Andalucía. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012; 30(10): 602-7.
48. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard-Eighth Edition. Tech. Rep. M07-A08. CLSI 2009; 29(2).
49. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline-Second Edition. Tech. Rep. M45-A2. CLSI, 2010; 30(18).
50. Clinical and Laboratory Standards Institute. User Evaluation of Between-Reagent Lot Variation; Approved Guideline. Tech. Rep. EP26-A. CLSI 2013; 33(12).

51. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0, 2015. [http:// www.eucast.org](http://www.eucast.org).
52. Blum RA, Kohli RK, Harrison NJ, Schentag JJ. Pharmacokinetics of Ampicillin (2.0 Grams) and Sulbactam (1.0 Gram) Coadministered to Subjects with Normal and Abnormal Renal Function and with End-Stage Renal Disease on Hemodialysis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989; 33(9): 1470-6.
53. Bergan T. Pharmacokinetics of beta-lactam antibiotics. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1984; 42: 83-98.
54. Zhu L, Wang N, Yang W, Zhang Y, Zhao X, Ji S. Population pharmacokinetics of intravenous moxifloxacin 400 mg once-daily dosage in infected patients. *J Infect Chemother.* 2014; 20(10): 621-6.
55. Siefert HM, Domdey-Bette A, Henninger K, Hucke F, Kohlsdorfer C, Stass HH. Pharmacokinetics of the 8-methoxyquinolone, moxifloxacin: A comparison in humans and other mammalian species. *J Antimicrob Chemother.* 1999; 43(B): 69-76.
56. Balfour JA, Wiseman LR. Moxifloxacin. *Drugs.* 1999; 57(3): 363-73.
57. Alffenaar JW, van Altena R, Bökkerink HJ, Luijckx GJ, van Soolingen D, Aarnoutse RE et al. Pharmacokinetics of Moxifloxacin in Cerebrospinal Fluid and Plasma in Patients with Tuberculous Meningitis. *Clin Infect Dis.* 2009; 49(7): 1080-2.

58. Nau R, Sorgel F, Eiffert H. Penetration of Drugs through the Blood-Cerebrospinal Fluid/Blood-Brain Barrier for Treatment of Central Nervous System Infections. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23(4): 858-83.
59. Ostergaard C, Sørensen TK, Knudsen JD, Frimodt-Møller N. Evaluation of moxifloxacin, a new 8-methoxyquinolone, for treatment of meningitis caused by a penicillin-resistant pneumococcus in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(7): 1706-12.
60. Foulds G, McBride TJ, Knirsch AK, Rodríguez WJ, Khan WN. Penetration of Sulbactam and Ampicillin into Cerebrospinal Fluid of Infants and Young Children with Meningitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987; 31(11): 1703-5.
61. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline, Tech. Rep. M26-A. CLSI 1999; 9(18).
62. Lister PD, Sanders CC. Pharmacodynamics of moxifloxacin, levofloxacin and sparfloxacin against *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 47: 811-8.
- 62 bis. Wispelwey B. Clinical implications of pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones. *Clin Infect Dis.* 2005; 41(2): 127-35.
63. Mouton JW, Brown DF, Apfalter P, Cantón R, Giske CG, Ivanova M et al. The role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in setting

- clinical MIC breakpoints: the EUCAST approach. Clin Microbiol Infect. 2012; 18(3): E37-45.
- 63 bis. Scheld WM, Tauber MG, Zak O, Sande MA. The influence of dosing schedules and cerebrospinal fluid bactericidal activity on the therapy of bacterial meningitis. J Antimicrob Chemother. 1985; 15(A): 303-12.
64. Pillai SK, Moellering RC, Eliopoulos GM. Antimicrobial combinations. En: Victor Lorian MD, editor. Antibiotics in Laboratory Medicine. 5^a ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 2005. p. 432-92.
- 64 bis. MacGowan A, Wootton M, Bowker K, Holt HA, Reeves D. Ampicillin-aminoglycoside interaction studies using *Listeria monocytogenes*. J Antimicrob Chemother. 1998; 41(3): 417-8.
65. MacGowan AP, Wootton M, Hedges AJ, Bowker KE, Holt HA, Reeves DS. A new time-kill method of assessing the relative efficacy of antimicrobial agents alone and in combination developed using a representative beta-lactam, aminoglycoside and fluoroquinolone. J Antimicrob Chemother. 1996; 38(2): 193-203.
- 65 bis. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-second Informational Supplement, Tech. Rep. M100-S22. CLSI 2012; 32(3).
66. Hoogkamp-Korstanje JA, Roelofs-Willemsse J. Comparative in vitro activity of moxifloxacin against Gram-positive clinical isolates. J Antimicrob Chemother. 2000; 45(1): 31-9.

67. Rolston KV, Frisbee-Hume S, LeBlanc B, Streeter H, Ho DH. In vitro antimicrobial activity of moxifloxacin compared to other quinolones against recent clinical bacterial isolates from hospitalized and community-based cancer patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003; 47(2): 441-9.
68. Barbosa J, Magalhães R, Santos I, Ferreira V, Brandão TR, Silva J et al. Evaluation of Antibiotic Resistance Patterns of Food and Clinical *Listeria monocytogenes* Isolates in Portugal. *Foodborne Pathog Dis.* 2013; 10(10): 861-6.
69. Madeo M, Musumeci R, Careddu AM, Amato E, Pontello MM, Cocuzza CE. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolates from human cases in northern Italy, 2008-2010: MIC determination according to EUCAST broth microdilution method. *J Chemother.* 2014; Apr 11:1973947814Y0000000187.
70. Poulsen PN, Carvajal A, Lester A, Andreasen J. In vitro susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from human blood and cerebrospinal fluid. *APMIS.* 1988; 96(3): 223-8.
71. Bertsch D, Muelli M, Weller M, Uruty A, Lacroix, C, Meile L. Antimicrobial susceptibility and antibiotic resistance gene transfer analysis of foodborne, clinical, and environmental *Listeria* spp. isolates including *Listeria monocytogenes*. *Microbiologyopen.* 2014; 3(1): 118-27.

72. Conter M, Paludi D, Zanardi E, Ghidini S, Vergara A, Ianieri A. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol*. 2009; 128(3): 497-500.
73. Srinivasan V, Nam HM, Nguyen LT, Tamilselvam B, Murinda SE, Oliver SP. Prevalence of Antimicrobial Resistance Genes in *Listeria monocytogenes* Isolated from Dairy Farms. *Foodborne Pathog Dis*. 2005; 2(3): 201-11.
74. Fernández L, Breidenstein EB, Hancock RE. Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resist Updat*. 2011; 14(1): 1-21.
75. Guillemot D, Varon E, Bernede C, Weber P, Henriët L, Simon S et al. Reduction of Antibiotic Use in the Community Reduces the Rate of Colonization with Penicillin G-Nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis*. 2005; 41(7): 930-38.
76. Guinane CM, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Contribution of Penicillin-Binding Protein Homologs to Antibiotic Resistance, Cell Morphology, and Virulence of *Listeria monocytogenes* EGDe. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(8): 2824-8.
77. Moellering RC Jr, Medoff G, Leech I, Wennersten C, Kunz LJ. Antibiotic Synergism Against *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1972; 1(1): 30-4.

78. Marklein G. Chemotherapie der Listeriose: In-vitro-Studie unter Berücksichtigung neuerer Penicilline und Cephalosporine. Dtsch Med Wochenschr. 1982; 107(11): 415-8.
79. Andes DR, Craig W. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibiotics in meningitis. Infect Dis Clin North Am. 1999; 13(3): 595-618.
80. Hof H, Fabrig J. Die Wirkung von Gyrase-Hemmern auf Listerien. Fortschr antimicrob antineoplast Chemother. 1987; 6-10: 1781-5.
81. Viale P, Furlanut M, Cristini F, Cadeo B, Pavan F, Pea F. Major role of levofloxacin in the treatment of a case of *Listeria monocytogenes* meningitis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007; 58(1): 137-9.
82. Lutsar I, McCracken GH, Friedland IR. Antibiotic Pharmacodynamics in Cerebrospinal Fluid. Clin Infect Dis. 1998; 27(5): 1117-27.
83. Mylonakis E, Hohmann EL, Calderwood SB. Central nervous system infection with *Listeria monocytogenes*. 33 years' experience at a general hospital and review of 776 episodes from the literature. Medicine (Baltimore). 1998; 77(5): 313-36.
84. Winslow DL, Damme J, Dieckman E. Delayed Bactericidal Activity of P-Lactam Antibiotics Against *Listeria monocytogenes*: Antagonism of Chloramphenicol and Rifampin. Antimicrob Agents Chemother. 1983; 23(4): 555-8.

85. Appleman MD, Cherubin CE, Heseltine PN, Stratton CW. Susceptibility Testing of *Listeria monocytogenes*. A Reassessment of Bactericidal Activity as a Predictor for Clinical Outcome. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1991; 14(4): 311-7.
86. Cherubin CE, Marr JS, Sierra MF, Becker L. *Listeria* and Gram-Negative Bacillary Meningitis in New York City, 1972-1979. Frequent Causes of Meningitis in Adults. *Am J Med*. 1981; 71(2): 199-209.
87. MacNair DR, White JE, Graham JM. Ampicillin in the treatment of *Listeria monocytogenes* meningitis. *The Lancet*. 1968; 291(7532): 16-18.
88. Pelletier LL. Lack of Reproducibility of Macrodilution MBCs for *Staphylococcus aureus*. 1984; 26(6): 815-8.
89. Tuomanen E, Cozens R, Tosch W, Zak O, Tomasz A. The Rate of Killing of *Escherichia coli* by P-Lactam Antibiotics Is Strictly Proportional to the Rate of Bacterial Growth. *J Gen Microbiol*. 1986; 132(5): 1279-304.
90. Stratton CW, Liu C, Weeks LS. Activity of LY146032 Compared with That of Methicillin, Cefazolin, Cefamandole, Cefuroxime, Ciprofloxacin, and Vancomycin against *Staphylococci* as Determined by Kill-Kinetic Studies. *Antimicrob Agents Chemother*. 1987; 31(8): 1210-5.
91. Hof H. Chemotherapy of *Listeria* infections. *GMS Infect Dis*. 2013; 1: Doc06.

92. Chin NX, Jules K, Neu HC. Synergy of Ciprofloxacin and Azlocillin in Vitro and in a Neutropenic Mouse Model of Infection. *Eur J Clin Microbiol.* 1986; 5(1): 23-8.
93. Neu HC, Chin NC, Labthavikul P. Antibacterial Activity of Coumermycin Alone and in Combination with Other Antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 1984; 25(6): 687-9.
94. Márquez B, Cáceres NE, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM, Van Bambeke F. Identification of the Efflux Transporter of the Fluoroquinolone Antibiotic Ciprofloxacin in Murine Macrophages: Studies with Ciprofloxacin-Resistant Cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(6): 2410-6.
95. Hof H. Antibiotic Treatment of Infections with Intracellular Bacteria. En: Paradise LJ, Friedman H, Bendinelli M, editores. *Opportunistic Intracellular Bacteria and Immunity.* New York: Plenum Press; 1999. 281-93.
96. Sauer JD, Witte CE, Zemansky J, Hanson B, Lauer P, Portnoy DA. *Listeria monocytogenes* that lyse in the macrophage cytosol trigger AIM2-mediated pyroptosis. *Cell Host Microbe.* 2010; 7(5): 412-9.