

R 19.68+

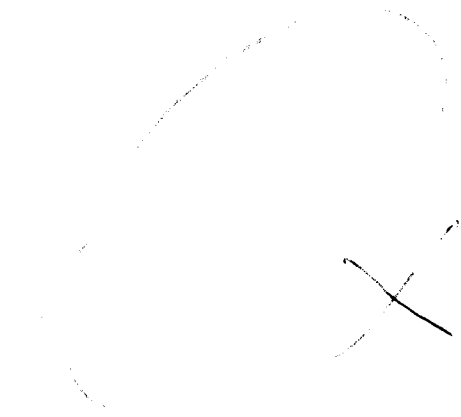
T.D.  
C/132

37 110

*Olivera Duffete*



# EFECTO DE INHIBIDORES DE BETA-LACTAMASAS EN LA ACTIVIDAD DE LOS LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES HUMANOS



Trabajo realizado en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla, para optar al grado de doctor, por la licenciada D<sup>a</sup> M.Carmen Conejo Gonzalo.

*[Signature]*

Sevilla, 1991

## FE DE ERRATAS:

1. En la pág 80, pie de figura, donde dice "Efecto de la exposición de la cepa de S.aureus productora de penicilinasa durante 4 horas...", debería decir "Efecto de la exposición de la cepa de S.aureus productora de penicilinasa durante 18 horas..."
2. En la pág 107, en la conclusión 10 donde dice "...sólo ácido clavulánico y amoxicilina/ácido clavulánico (4/1), a concentraciones elevadas (100 mg/l), mostraron...", debería decir "...sólo ácido clavulánico asociado a amoxicilina (proporción 1/4), a concentraciones elevadas (100 mg/l), mostró..."

**Tabla X:** Efecto de la preincubación de los PMN con diferentes concentraciones (1, 10 y 100 mg/l) de ampicilina, sulbactam y la combinación ampicilina / sulbactam (2/1) en la fagocitosis de la cepa de *S.aureus* no productora de penicilina (n = 3). Tiempo de fagocitosis: 12 minutos.

Antimicrobiano	Concentración	Porcentaje de fagocitosis <sup>a</sup>
Sin antimicrobiano		38 ± 7
Ampicilina	1	40 ± 5
	10	34 ± 8
	100	38 ± 8
Sulbactam	1	35 ± 10
	10	41 ± 6
	100	38 ± 10
Ampicilina / sulbactam (2 / 1)	1	35 ± 10
	10	40 ± 10
	100	42 ± 12

<sup>a</sup>: Bacterias opsonizadas con HPS al 5 %



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

D. Evelio J. Perea, Catedrático del Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla y D. Alvaro Pascual, Profesor Titular del mismo Departamento

**CERTIFICAN:**

Que D<sup>a</sup> M.Carmen Conejo Gonzalo, ha realizado bajo su dirección la Tesis Doctoral titulada "Efecto de inhibidores de betalactamasas en la actividad de los leucocitos polimorfonucleares humanos".

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmamos el presente certificado, en Sevilla a 20 de Noviembre de 1991.

VºBº Director del Departamento Prof. E.J. Perea Prof. A. Pascual

A mis padres

# **AGRADECIMIENTOS**

A los Profesores Evelio J. Perea Pérez y Alvaro Pascual Hernández, por su inestimable dirección y apoyo para la realización de este estudio.

Al Profesor Guillermo López-López que desinteresadamente me prestó su ayuda y supo darme ánimos en los momentos difíciles.

A M.Carmen Guzmán Morgaz que amablemente colaboró en la realización técnica del trabajo.

A Gregorio Salcedo Gutiérrez, por la realización del trabajo gráfico.

A Roque Cabrera Cabrera, por su colaboración al mecanografiar este texto.

A todos mis compañeros del Departamento de Microbiología.

Gracias.

# INDICE



	Pág
INTRODUCCION.....	1
MATERIAL.....	19
METODOS.....	26
RESULTADOS.....	39
DISCUSION.....	92
CONCLUSIONES.....	105
BIBLIOGRAFIA.....	109



# INTRODUCCION

## Los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos

La importancia de las células fagocíticas en la defensa del huésped frente a las infecciones bacterianas es conocida desde principios de siglo. Cuando las bacterias consiguen superar las barreras mecánicas que suponen las superficies cutáneas y mucosas, el desarrollo o no de una enfermedad infecciosa dependerá en gran medida de la capacidad que tengan estas células para combatir la invasión microbiana (1).

Entre las células fagocíticas se incluyen los monocitos circulantes, los macrófagos y los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) y eosinófilos. Los PMN son las células fagocíticas más numerosas circulando en sangre periférica, siendo además las primeras en llegar al lugar de la infección.

Los PMN surgen de las células madre pluripotenciales de la médula ósea (2). Estos granulocitos comienzan como mieloblastos, que se diferencian por mitosis en mielocitos. A partir de este punto no hay división alguna, sino que se producen alteraciones citoplasmáticas y nucleares. Este proceso, de una duración de aproximadamente 7 días, da lugar a un PMN totalmente maduro, que se desarrolla a través de etapas conocidas como metamielocitos (o juveniles si se observan en sangre periférica), bandas, y finalmente el neutrófilo maduro con el núcleo segmentado.

En su desarrollo el neutrófilo adquiere 2 poblaciones de gránulos fundamentalmente. Los primarios (azurófilos), aparecen durante el período mitótico y contienen mieloperoxidasa, hidrolasas ácidas, lisozima, catepsina G, BPI (Bactericidal/permeability -increasing factor), defensinas (antes conocidas como proteínas catiónicas lisosomiales) y proteasas ácidas, incluida la elastasa (3). Los gránulos primarios se funden con el fagosoma, después de la fagocitosis, y desarrollan su actividad microbicida a nivel local. Los gránulos secundarios (específicos) se forman durante el período

de maduración, y contienen lactoferrina, lisozima, citocromo b, proteína de unión de la vitamina B<sub>12</sub> y ciertas moléculas de receptores. Gran parte del contenido de estos gránulos es vertido al exterior de la célula, donde se piensa ejerce una función reguladora de la respuesta inflamatoria (4).

Recientemente, se han identificado los llamados "gránulos terciarios", que contienen gelatinasa, citocromo B y el receptor de carácter glicoproteico MAC-1, importante mediador en la adherencia. El papel de estos gránulos en la función de los PMN no es del todo conocido.

Los PMN circulantes en sangre periférica representan sólo el 5% del total corporal. La mitad aproximadamente de la población intravascular de los PMN no se encuentra circulando por el torrente sanguíneo, sino que está adherida al endotelio de los pequeños vasos, fenómeno conocido con el nombre de marginación. La vida media de los PMN en sangre es de 6-8 horas. Después se localizan en los tejidos, donde permanecen funcionales 1-2 días. Las células senescentes son eliminadas por los macrófagos esplénicos o a través de las superficies mucosas.

## Funciones de los PMN

### Quimiotaxis:

Los neutrófilos se dirigen hacia el lugar donde se localiza la infección o inflamación en respuesta a sustancias químicas originadas localmente. Este proceso de migración dirigida recibe el nombre de quimiotaxis. Las sustancias quimiotácticas pueden ser generadas por bacterias (por ejemplo, formilmetionilpéptidos), por macrófagos o neutrófilos en el lugar de la infección (por ejemplo, el leucotrieno LTB<sub>4</sub>) o por activación del sistema del complemento (fundamentalmente C<sub>5a</sub>). Los neutrófilos son capaces de detectar concentraciones nanomolares de estas sustancias, reconocer diferencias a lo

largo del tiempo en la ocupación de receptores quimiotácticos de distintas partes de su superficie celular, integrar esta información y trasladarse con un movimiento direccional hacia el lugar donde se localiza la inflamación.

#### Adherencia:

En presencia de señales quimiotácticas, los neutrófilos se adhieren al endotelio capilar, otros tejidos y a la superficie de los microorganismos. El fenómeno de la adherencia es específico, es decir mediado por receptores. Se reconocen en el neutrófilo receptores para el fragmento  $C_{3b}$  del complemento y para los componentes de la matriz extracelular laminina y fibronectina. La laminina, fibronectina y la fracción  $C_{3b}$  del complemento pueden unirse a otros tejidos del huésped o a la superficie de los microorganismos, facilitando así la fijación del neutrófilo.

#### Reconocimiento de la diana (Opsonización) e Ingestión (Fagocitosis)

El término opsonización hace referencia a un proceso por el que las partículas que deben ser fagocitadas se cubren de unas sustancias, denominadas opsoninas, que van a permitir al neutrófilo el reconocimiento de esas partículas y facilitar su ingestión. El sistema de opsoninas está formado por unas opsoninas termoestables, representadas por la Inmunoglobulina G (Ig G) principalmente, y unas opsoninas termolábiles, representadas por la fracción  $C_{3b}$  del complemento. Ambas se unen a receptores específicos de la superficie bacteriana, desencadenando el proceso de fagocitosis una vez que entran en contacto con las células fagocíticas. No todos los microorganismos tienen los mismos requerimientos opsónicos. En el caso particular de la fagocitosis de Staphylococcus aureus, existen evidencias de que el sistema de opsoninas termolábiles juega un papel de mayor relevancia que las inmunoglobulinas (5,6). En este sentido, el peptidoglicano de estafilococo es capaz de activar el complemento a través de la vía alternativa, que no depende de anticuerpos, lo que se traduce en la fijación

de moléculas de  $C_{3b}$  opsónicamente activas en la envuelta celular (7).

Una vez opsonizado, el microorganismo es fácilmente reconocido e ingerido por las células fagocíticas, quedando incluido en unas vacuolas denominadas fagosomas.

En este momento los lisosomas migran hacia los fagosomas y se fusionan con ellos, liberando su contenido en el interior. Tras este proceso conocido como degranulación los fagosomas pasan a denominarse fagolisosomas.

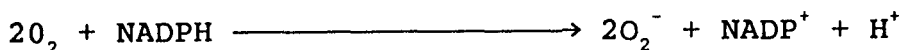
#### Destrucción intracelular:

Para la destrucción intracelular de los microorganismos se reconocen en el PMN 2 sistemas fundamentales, uno independiente de oxígeno, representado por el contenido enzimático de los gránulos con capacidad microbicida (lisozima, catepsina G, lactoferrina, BPI, defensinas...) y otro dependiente de oxígeno, mediado por radicales tóxicos del mismo que se producen como resultado de la llamada explosión oxidativa o explosión respiratoria (3,4,8,9).

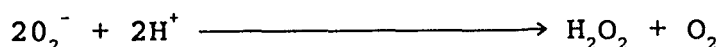
El término explosión respiratoria hace referencia a una serie de cambios abruptos en el metabolismo del oxígeno que ocurren cuando el fagocito ingiere bacterias u otras partículas, o contacta con diferentes estimuladores de membrana, como es el caso del acetato de forbol miristato (PMA), ionóforos, fracción  $C_{5a}$  del complemento y una serie de péptidos sintéticos o naturales.

Una vez que los PMN han sido estimulados, se produce un aumento brusco en el consumo de oxígeno por parte de los mismos y comienzan a liberar grandes cantidades de aniones superóxido ( $O_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al medio circundante. Al mismo tiempo, las células comienzan a oxidar grandes cantidades de glucosa por la vía de la hexosa monofosfato.

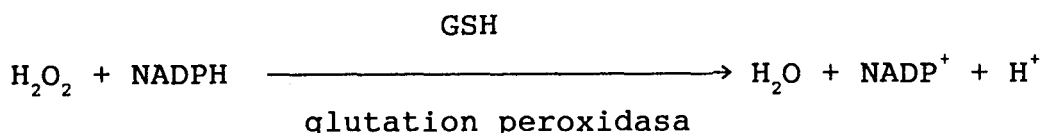
La primera reacción que se produce consiste en la reducción del oxígeno a  $O_2^-$  a expensas de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida (NADPH), que actúa como dador de electrones:



La mayor parte del  $O_2^-$  es rápidamente convertida en  $H_2O_2$  por dismutación:



La NADPH también participa como dador de electrones en una reacción encaminada a eliminar  $H_2O_2$ , dependiente del glutatión:

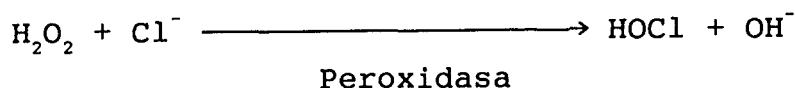


El aumento en el consumo de NADPH activa la oxidación de la glucosa por la vía de la hexosa monofosfato, conduciendo a la reposición del NADPH que se había consumido.

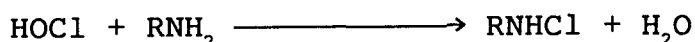
Por la activación de la explosión oxidativa se generan agentes microbicidas resultantes de la reducción parcial del oxígeno. El anión superóxido y el peróxido de hidrógeno son muy importantes, pues constituyen los productos iniciales de una gran cascada que conducirá a la formación de sustancias altamente tóxicas para los microorganismos. Estos potentes microbicidas pueden ser de 2 tipos, halógenos oxidados y radicales oxidantes.

Los halógenos oxidados son potentes antimicrobianos (por ejemplo el Clorox, que no es más que una solución de hipoclorito sódico). En el PMN es el  $Cl^-$  el sustrato de la reacción catalizada por una hemoproteína que se localiza en los gránulos azurófilos, la mieloperoxidasa, y en la que el  $H_2O_2$  es

utilizado para oxidar este sustrato:

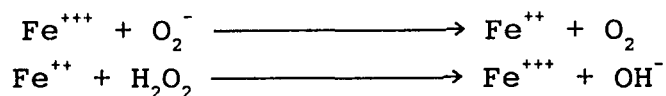


En los tejidos, el HOCl reacciona con aminos ambientales para formar variadas cloraminas con distintas propiedades biológicas (10):



Algunos de estos compuestos, como la cloramina ( $\text{NH}_2\text{Cl}$ ) son incluso más potentes microbicidas que el propio HOCl.

Los radicales oxidantes son menos conocidos. Entre ellos se encuentra el radical hidróxilo ( $\text{OH}^-$ ) (11). Este radical reacciona casi instantáneamente con la mayoría de las moléculas orgánicas que encuentra, y se produce en la llamada "reacción de Haber-Weiss", en la que el  $\text{Fe}^{+++}$  es reducido a  $\text{Fe}^{++}$  por el  $\text{O}_2^-$ , para después volver a oxidado a  $\text{Fe}^{+++}$  por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  con la consiguiente producción de  $\text{OH}^-$ :



La fuente de hierro para esta reacción ha sido muy discutida. Actualmente se piensa que el mejor candidato es la ferritina, que liberaría  $\text{Fe}^{++}$  al medio, cuando está expuesta al  $\text{O}_2^-$  (12).

Los productos de la explosión respiratoria son fundamentales para conseguir la muerte intracelular de los microorganismos, resultando particularmente importantes en el caso de Staphylococcus aureus. Esto se pone de manifiesto en los pacientes con Enfermedad granulomatosa crónica. Los granulocitos de estos pacientes no presentan defectos en la quimiotaxis, fagocitosis ni degranulación, pero son incapaces



de destruir las bacterias una vez que las han ingerido, por presentar defectos en la actividad microbicida oxígeno-dependiente (3, 4, 13). En la mayoría de los pacientes se trata de una enfermedad hereditaria ligada al cromosoma X, caracterizada por anomalías cuantitativas o cualitativas en el citocromo  $b_{558}$ , proteína compleja involucrada en el transporte de electrones hasta la formación de aniones superóxido. En una minoría de casos, sin embargo, la herencia es autosómica recesiva y existe un déficit de proteínas citosólicas que actúan como cofactores en la activación de la cadena respiratoria del PMN (13). La ausencia de productos de la explosión oxidativa en los PMN de estos pacientes tiene como traducción clínica el padecimiento de infecciones recidivantes, siendo Staphylococcus aureus uno de los patógenos más frecuentemente involucrados.

#### Interacciones entre los antimicrobianos y los leucocitos PMN

La modulación de los mecanismos de defensa por los antimicrobianos ha constituido un importante foco de atención en los últimos 20 años. Actualmente, aún aceptando que la principal razón para utilizar los antimicrobianos se fundamenta en la capacidad que tienen para destruir o inhibir el crecimiento de los microorganismos, existen suficientes evidencias para apoyar que la acción estimuladora o supresora de estas sustancias sobre los mecanismos defensivos del huésped puede, en ocasiones, desempeñar un importante papel en el éxito o fracaso de un tratamiento antibiótico.

Las interacciones de los agentes antimicrobianos con las funciones de las células fagocíticas han sido estudiadas exhaustivamente, y los resultados han sido objeto de excelentes revisiones en los últimos años (14-18).

Las células fagocíticas más frecuentemente utilizadas en los diferentes estudios han sido los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos, debido a la sencillez técnica

de su aislamiento, además de a su papel relevante en la lucha contra la infección.

Una vertiente interesante en el estudio de las interacciones de los antimicrobianos con el sistema fagocítico es el análisis del efecto que tienen concentraciones subinhibitorias de estos fármacos sobre las bacterias, determinando cambios morfológicos y estructurales en las mismas, que con frecuencia van a facilitar su reconocimiento y destrucción por parte de las células fagocíticas (19, 20). Este efecto también se puede lograr exponiendo a las bacterias durante muy corto período de tiempo a concentraciones elevadas de los antimicrobianos (21-23).

Los resultados de estos estudios resultan difíciles de interpretar por la falta de uniformidad metodológica entre los distintos autores. Así, existen variaciones en la naturaleza de la cepa bacteriana elegida, el tiempo de exposición a los antimicrobianos, la naturaleza y concentración del antibiótico usado, la función evaluada y la técnica empleada (17, 19). A pesar de ello, se puede afirmar que los betalactámicos en general, son capaces de determinar modificaciones en microorganismos como Staphylococcus aureus (23-31), estreptococos del grupo B (32), algunas enterobacterias (24, 25, 33, 34) y Haemophilus influenzae tipo b(30), que los hace más vulnerables frente a las células fagocíticas. El aumento de la actividad fagocítica por el pretratamiento no está del todo aclarado, pero podría ser debido a un cambio en los requerimientos opsónicos de la bacteria o a una estimulación de los mecanismos bactericidas de los leucocitos por parte de las bacterias modificadas (28, 29, 33-35).

Con respecto a los inhibidores de la síntesis proteica, como los macrolidos o clindamicina, ha quedado demostrado que la exposición de cocos gram positivos a concentraciones inhibitorias de los mismos determina una mejor fagocitosis y muerte intracelular de estos microorganismos. Este efecto es

debido más que a una actividad fagocítica amplificada, a una facilitación de la opsonización (36-41).

El estudio de la influencia directa de los antimicrobianos sobre las células fagocíticas ha constituido otro importante foco de atención para los distintos grupos de investigación. Las fases del proceso fagocítico sobre las que se han centrado los diversos estudios han sido la quimiotaxis o migración direccional, las funciones fagocíticas propiamente dichas, como la ingestión, capacidad bactericida y respuesta metabólica y, finalmente, la penetración y actividad intracelular de los antimicrobianos.

La influencia de los antimicrobianos sobre la quimiotaxis ha sido estudiada por numerosos autores. Aunque se observan algunas discrepancias al analizar los resultados, derivados fundamentalmente de las diferentes condiciones en que se realizan los experimentos, parece existir unanimidad en reconocer el efecto negativo ejercido por las tetraciclinas (42-44) y los aminoglucósidos (45-47) y la ausencia de efecto de los betalactámicos (44, 46, 48-50).

El proceso fagocítico propiamente dicho puede ser evaluado siguiendo distintos métodos (51). La capacidad de ingestión de microorganismos o partículas por los leucocitos es determinada frecuentemente por microscopía óptica, contando el número medio de partículas ingeridas por fagocito (índice fagocítico) o el porcentaje de fagocitos que contienen partículas ingeridas, o por determinación de la radioactividad intracelular después de la ingestión de bacterias marcadas radioactivamente. Este último método es mucho más reproducible que el anterior.

La capacidad bactericida de las células fagocíticas puede ser medida microbiológicamente mediante recuento en agar de las colonias producidas por las bacterias supervivientes en el interior de los fagocitos. Durante el proceso fagocítico además

se produce una activación del metabolismo leucocitario, que puede evaluarse midiendo la quimioluminiscencia emitida o la producción de radicales tóxicos de oxígeno. Una vez más, surgen controversias a la hora de analizar los resultados obtenidos por los diferentes investigadores. A pesar de ello, parece existir conformidad sobre el efecto negativo ejercido por las tetraciclinas, posiblemente mediado por una actividad quelante del calcio intracelular por parte de estos antimicrobianos (17, 52). Los betalactámicos, en general, no suelen influenciar el proceso fagocítico, aunque en el caso de algunas cefalosporinas se ha demostrado un efecto potenciador de los mecanismos bactericidas de los leucocitos PMN (49, 53).

Otro grupo de antimicrobianos que actúan sinérgicamente con los neutrófilos son los macrólidos. Se postula que ocurriría una modificación en la estructura de estos antimicrobianos por interacción con los productos de la explosión oxidativa de los leucocitos, resultado moléculas más tóxicas para los microorganismos (54).

El estudio de la penetración y actividad intracelular de los antimicrobianos resulta de gran interés, por el hecho de que existen microorganismos que son capaces de sobrevivir e incluso multiplicarse en el interior de las células fagocíticas y evitar de este modo la acción de los antibióticos que no penetran bien en el interior de las células, como es el caso de aminoglucósidos y los betalactámicos.

Una buena penetración no implica, sin embargo, que el antimicrobiano mantenga su actividad a nivel intracelular (55, 56). Existen numerosos factores intrínsecos del antimicrobiano, sitio específico de concentración de la droga a nivel intracelular, efectos del medio intracelular en la actividad biológica del antibiótico y sensibilidad del microorganismo, y la influencia directa de la droga sobre las funciones de los fagocitos. Rifampicina presenta una buena penetración y actividad intracelular, demostrada tanto "in vitro" como "in

vivo" (56, 57). Tetraciclinas, clindamicina y algunos macrólidos, penetran de manera adecuada en las células fagocíticas y se mantienen activos en el citoplasma, pero probablemente no dentro del fagolisosoma por el descenso del pH que ocurre en dicha organela (58, 59). Las nuevas quinolonas parecen mostrar una buena penetración y actividad intracelular (60-62).

Las propiedades inmunomoduladoras de los antimicrobianos deberían tenerse en cuenta a la hora de elegir tratamiento antibiótico en un proceso infeccioso, particularmente en el caso de pacientes inmunocomprometidos (63).

### **Inhibidores de betalactamasas**

Uno de los principales mecanismos de resistencia a los antibióticos betalactámicos se debe a la producción de betalactamasas por parte de las bacterias. Estos enzimas se encuentran tanto en bacterias gram positivas como gram negativas y su papel primario no es el de proteger al microorganismo de la acción de los betalactámicos, sino intervenir en el ensamblaje del peptidoglicano de la pared celular bacteriana. Las betalactamasas pueden encontrarse a nivel extracelular o en el espacio periplásmico. En general, las betalactamasas de los gram positivos son excretadas al medio, mientras que en el caso de los gram negativos se localizan fundamentalmente en el espacio periplásmico, aunque puede producirse cierta liberación al medio circundante (64, 65).

El mecanismo de acción de las betalactamasas consiste en la hidrólisis del enlace amida del anillo betalactámico, convirtiendo al antibiótico en una sustancia inactiva desde el punto de vista antibacteriano.

Las betalactamasas pueden estar codificadas genéticamente en plásmidos o en el cromosoma bacteriano. Las betalactamasas plasmídicas son especialmente problemáticas, por la facilidad

de transferencia del material genético extracromosómico que las codifica de una bacteria a otra.

Uno de los aspectos más preocupantes de las betalactamasas de origen cromosómico es que su producción puede ser inducida fácilmente. Los mejores inductores conocidos son los propios antibióticos betalactámicos, que subsecuentemente serán hidrolizados por el enzima producido. En algunas ocasiones mutantes desreprimidos de forma estable quedan seleccionados, lo que determina una alta producción de enzima por estas bacterias (66-69).

En la actualidad se conocen una gran variedad de betalactamasas y casi tan pronto como un nuevo betalactámico es introducido en el uso clínico, se identifica una nueva betalactamasa, antes desconocida, con capacidad para destruirlo.

En la lucha frente a este tipo de resistencia se han seguido dos estrategias fundamentales, la primera consiste en intentar sintetizar moléculas de betalactámicos con mayor estabilidad frente a la hidrólisis enzimática, y la segunda en desarrollar inhibidores que se unan y/o inactiven a las betalactamasas, proporcionando así protección a los sustratos betalactámicos.

Los inhibidores de betalactamasas pueden ser clasificados como reversibles o irreversibles (64). Inhibidores reversibles son aquellos que se unen al enzima sin que se produzca ninguna interacción química entre ellos, de forma que cuando el inhibidor es eliminado, el enzima recupera su actividad (70). Muchos betalactámicos se comportan como inhibidores de este tipo.

Los inhibidores irreversibles actúan sobre las betalactamasas determinando la destrucción de su actividad enzimática. Dentro de este grupo se encuentran los llamados

"inactivadores suicidas", que son moléculas que se deben unir inicialmente al sitio activo del enzima, y son convertidas en inactivadores por la propia acción catalítica del enzima (64).

Ácido clavulánico fue el primer inactivador suicida de betalactamasas descrito en la literatura (71). Su estructura consta de un anillo betalactámico (figura 1) que en lugar de un átomo de azufre, característico del anillo tiazolidínico, presenta uno de oxígeno. Sulbactam (figura 2) y tazobactam (figura 3) son sulfonas del ácido penicilánico y al igual que ácido clavulánico, se comportan como inactivadores suicidas. A pesar de ser derivados betalactámicos, los tres exhiben muy pobre actividad antibacteriana intrínseca. En cuanto a su espectro de acción, referido a las betalactamasas, son muy efectivos frente a betalactamasas incluídas en el grupo 2 de la clasificación de K. Bush (tabla I)(72, 73), siendo ácido clavulánico, en general, el más activo de los tres. Con respecto a las cefalosporinasas cromosómicas, incluídas en el grupo 1 de la clasificación de K. Bush, se ha descrito cierta actividad por parte de tazobactam y en menor grado sulbactam, mientras que ácido clavulánico no resulta efectivo (74-77). Por otra parte, ácido clavulánico puede comportarse como inductor enzimático de este tipo de betalactamasas, con lo que su asociación a un betalactámico se traduciría en antagonismo en lugar de sinergia. Sulbactam y tazobactam, sin embargo, son muy pobres inductores de cefalosporinasas (75,77-81). La inducción enzimática producida por ácido clavulánico es un proceso reversible, y no debe ser confundido con el proceso de selección de mutantes desreprimidos de forma estable, que puede acontecer por ejemplo con el uso de las nuevas cefalopporinas (79, 82).

En la práctica clínica ácido clavulánico se ha combinado principalmente con amoxicilina y ticarcilina, y sulbactam con ampicilina. Estas asociaciones se han mostrado eficaces en el tratamiento de una gran variedad de infecciones, especialmente en las infecciones respiratorias agudas y las del tracto urinario. Tazobactam, en combinación con piperacilina está

siendo evaluado en ensayos clínicos.



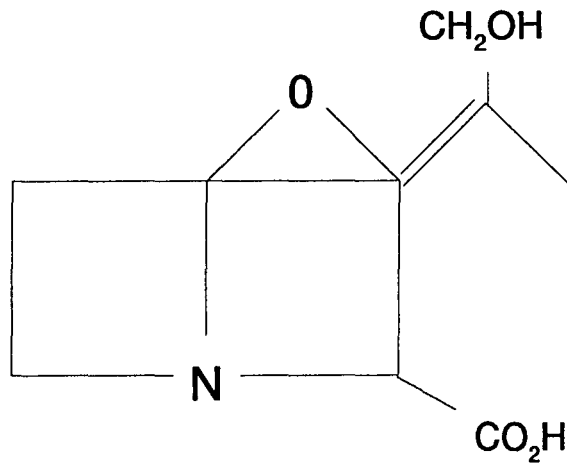


Figura 1: Estructura del ácido clavulánico.

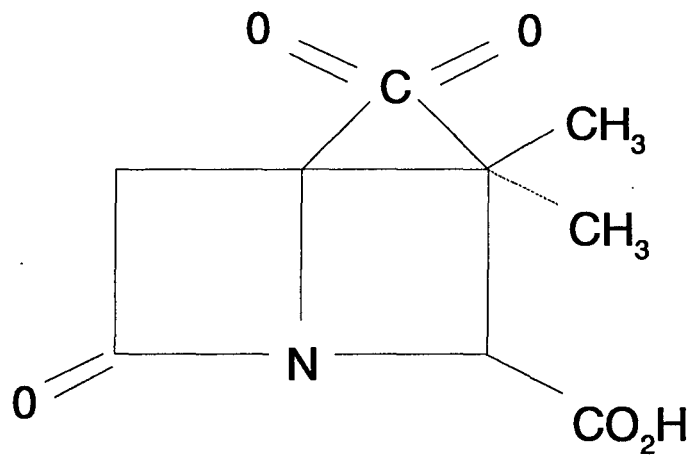


Figura 2: Estructura del Sulbactam.  
(CP - 45, 899)

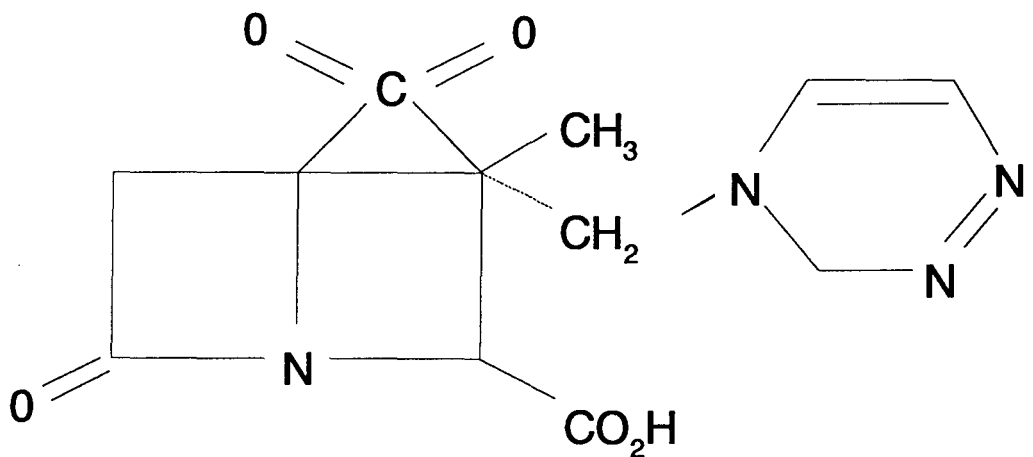


Figura 3: Estructura del Tazobactam.  
(YTR - 830 ó CL 298, 741)

Tabla I: Clasificación de las betalactamasas \*

Grupo	Descripción	Enzimas representativas
1	Cefalosporinas; no inhibidas por ácido clavulánico	Enzimas cromosómicas de <u>Pseudomonas aeruginosa</u> , <u>Enterobacter cloacae</u> y otras bacterias gram negativas
2a	Penicilinasas; inhibidas por ácido clavulánico	Penicilinasas de bacterias gram positivas
2b	Betalactamasas de amplio espectro clásicas; inhibidas por ácido clavulánico	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2b'	"Nuevas" betalactamasas de muy amplio espectro; inhibidas por ácido clavulánico	TEM-3 a TEM-10; SHV-2, SHV-3
2c	Carbenicilinasas; inhibidas por ácido clavulánico	PSE-1, PSE-3, PSE-4, BRO-1, BRO-2
2d	Cloxacilinasas	OXA-1 a OXA-7; PSE-2
2e	Cefalosporinasas; inhibidas por ácido clavulánico	Enzimas de <u>Proteus vulgaris</u> y <u>Citrobacter diversus</u>
3	Metaloenzimas; no inhibidas por ácido clavulánico	Enzimas de <u>Pseudomonas maltophilia</u> y <u>Bacillus cereus</u>
4	Penicilinasas; no inhibidas por ácido clavulánico	Enzimas cromosómicas de <u>Alcaligenes faecalis</u> , <u>Clostridium butyricum</u> y <u>Pseudomonas cepacia</u>

\* Modificado de Bush. Antimicrob Agents Chemother. 33: 259-263, 264-270, 271-273. 1989.

## Hipótesis de trabajo

En la nueva concepción de los antimicrobianos se contempla también su papel como inmunomoduladores. Los inhibidores de betalactamasas asociados a betalactámicos constituyen una buena alternativa terapéutica en las infecciones por microorganismos productores de betalactamasas. Teniendo en cuenta la ausencia de estudios sobre la interacción entre estas sustancias y los mecanismos de defensa del huésped, decidimos la realización de este trabajo, con la intención de obtener una información concreta sobre la influencia de ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, solos o en combinación con amoxicilina, ampicilina y piperacilina respectivamente, en las funciones fagocíticas y bactericidas de los leucocitos polimorfonucleares humanos.

La hipótesis de trabajo se basa en el estudio de cuatro aspectos fundamentales:

1. Efecto de concentraciones subinhibitorias de estos fármacos sobre la fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares de Staphylococcus aureus productor y no productor de penicilinasa .

2. Influencia directa de concentraciones terapéuticas de estos antimicrobianos sobre la capacidad fagocítica de los PMN.

3. Efecto de concentraciones terapéuticas de estos antimicrobianos sobre los mecanismos bactericidas dependientes del oxígeno de los PMN, estudiando la producción de aniones superóxido y peróxido de hidrógeno por estas células tras estimularlas con el estimulante de membrana acetato de forbol miristato (PMA).

4. Estudio de la actividad intracelular de estos fármacos frente a Staphylococcus aureus.

**MATERIAL**

## CEPAS BACTERIANAS

Se utilizaron dos cepas de Staphylococcus aureus, una productora y otra no productora de penicilinas. La cepa productora de penicilinas se aisló de un hemocultivo en el Hospital Universitario "Virgen Macarena" de Sevilla, y su identificación se realizó por métodos estándar de identificación (83). Como cepa no productora de penicilinas se utilizó S. aureus ATCC 25923.

Para su posterior utilización se conservaron congeladas en alícuotas repartidas en leche descremada al 10% en agua destilada, a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En su posterior recuperación se empleó medio Agar Mueller Hinton.

## LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES HUMANOS (PMN)

En todos los experimentos se utilizaron leucocitos polimorfonucleares humanos procedentes de sangre venosa periférica de donantes adultos sanos.

## MEDIOS DE CULTIVO

### Agar Mueller Hinton (Difco)

Infusión de carne . . . . .	300 g.
Hidrolizado de caseína . . . . .	17,5 g.
Almidón . . . . .	1,5 g.
Agar . . . . .	17 g.
Agua destilada . . . . .	1000 c.c.

### Caldo Mueller Hinton (Difco)

Infusión de carne . . . . .	300 g.
Hidrolizado de caseína . . . . .	17,5 g.
Almidón . . . . .	1,5 g.
Ca <sup>++</sup> . . . . .	6 mg.
Mg <sup>++</sup> . . . . .	5 mg.
Agua destilada . . . . .	1000 c.c.

**Medio RPMI 1640 (Gibco)**

Medio utilizado para cultivo de linfocitos, compuesto por gran cantidad de aminoácidos, coenzimas, vitaminas, sales y glucosa. Para su empleo con polimorfonucleares se suplementó con suero bovino fetal al 1% (Sigma Chemical Company. St. Louis. USA.)

**SOLUCIONES TAMPÓN****Tampón fosfato salino (PBS) pH 7,2**

$\text{KH}_2\text{PO}_2$	. . . . .	144 mg.
NaCl	. . . . .	8,5 g.
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	. . . . .	795 mg.
Agua destilada	. . . . .	1000 c.c.

**Solución salina equilibrada de Hanks modificada (sin  $\text{NaHCO}_3$  ni rojo fenol) pH 7,4 (Sigma Chemical Company. St. Louis. USA).**

$\text{CaCl}_2$	. . . . .	140 mg.
KCl	. . . . .	400 mg.
$\text{KH}_2\text{PO}_2$	. . . . .	60 mg.
NaCl	. . . . .	6,8 g.
$\text{Na}_2\text{HPO}$	. . . . .	48 mg.
$\text{MgSO}_4$	. . . . .	97,7 mg.
Glucosa	. . . . .	1 g.
Agua destilada	. . . . .	1000 c.c.

Para su utilización con PMN y específicamente para evitar la agregación espontánea y adherencia de las células a las paredes de los viales, se adicionó con gelatina a concentración final de 0,1% (GHBSS).

**Tampón fosfato 0,1 M pH 6**

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$	. . . . .	12,19 grs.
$\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	. . . . .	3,3 grs.
Agua destilada	. . . . .	1000 c.c.

**Tampón fosfato 0,1 M pH 8**

$\text{PO}_4 \text{H}_2\text{Na}$ . . . . .	0,74 g.
$\text{PO}_4 \text{HNa}_2 \cdot 7\text{H}_2 \text{O}$ . . . . .	25,4 g.
Agua destilada . . . . .	1000 c.c.

**REACTIVOS. COMPUESTOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS****Material radioactivo y líquido de centelleo**

- . 2-3H adenina, solución acuosa con etanol al 2%, de actividad específica 24 Ci/ mmol (Amersham Internacional, UK).
- . Coctel de centelleo líquido Beckman Read y Micro (Beckman Instruments, Inc. USA): líquido de centelleo especial para soluciones acuosas con solvente orgánico incorporado.

**Fuente opsónica**

Mezcla de sueros humanos (HPS), obtenidos de 10 donantes sanos, que fueron debidamente mezclados y distribuidos en alícuotas de 1 ml. y almacenados a  $-70^\circ\text{C}$ .

**Reactivos para determinación de producción de Betalactamasa**

- . Nitrocefín: cefalosporina cromógena (Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England). Tabletetas liofilizadas de 1 ml.
- . Fluido de rehidratación (Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England):
  - . 1,9 ml tampón fosfato 0,1 M pH 7.
  - . 0,1 ml de dimetilsulfóxido.

Se rehidrata una tableta de nitrocefín con 2 ml. del fluido de rehidratación. La solución reconstruída presenta una coloración amarillenta. Debe ser conservada en oscuridad a  $4^\circ\text{C}$ .

**Reactivos para aislamiento de PMN**

- . Dextrano. Para la sedimentación de eritrocitos se utilizó solución de dextrano T-70 (Sigma Chemical

- Company. St. Louis. USA) al 6% en solución salina.
- . Ficoll-Paque. Medio de separación de linfocitos (Pharmacia LKB Biotechnology. AB, Uppsala. Sweden).
  - . Cloruro amónico. Para la lisis de eritrocitos se utilizó solución al 0,85% de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Merck) en agua destilada.

#### Reactivos para estudio mecanismos bactericidas dependientes del oxígeno de los PMN

- . Superóxido dismutasa (3000 U/mg.) (Sigma Chemical Company. St. Louis. USA).
- . Acetato de forbol miristato (PMA) (Sigma Chemical Company. St. Louis. USA). Se prepararon dos soluciones stock que se distribuyeron en alícuotas de 1 ml. y se almacenaron a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su uso:
  - . Stock 1: solución de PMA en dimetilsulfóxido (DMSO) (Panreac. Montplet y Esteban SA. Barcelona-Madrid) a una concentración de 1 mg/ml.
  - . Stock 2: resultado de diluir 1 volumen de stock 1 en 4 de DMSO (concentración final 0,2 mg/ml). La solución de PMA de trabajo tenía una concentración de 2000 nM (30,8  $\mu\text{l}$ . de stock 2 en 5 ml. de GHBSS).
- . Citocromo C (Sigma Chemical Company. St. Louis. USA).
- . Peroxidasa de rábano picante (200 U/mgr.) (Sigma Chemical Company. St. Louis. USA).
- . Peróxido de hidrógeno 30% (8,8235 N) (Foret, SA. Barcelona).
- . NaOH 3M en agua destilada.

#### Colorantes

- . Solución de azul tripan al 0,5 % (Flow Laboratories, Ayrshire. Scotland).
- . Solución de Türk: Acido acético y violeta de genciana en solución para recuento de leucocitos (Merck, Darmstadt, Germany).



**ANTIMICROBIANOS**

En todos los casos se utilizó polvo valorado, que fue pesado en una balanza de precisión de acuerdo a su actividad específica.

Se emplearon solventes específicos para disolver el polvo seco y así obtener soluciones madre que fueron almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  en alícuotas. Posteriormente se utilizaron diluyentes apropiados para preparar las soluciones de trabajo (tabla II).

Tabla II:

Antibiótico	Casa suministradora	Solvente	Diluyente
Amoxicilina <sup>a</sup>	Beecham	Tampón fosfato 0,1M, pH8	Tampón fosfato 0,1 M, pH 6. Agua destilada
Acido clavulánico	Beecham	Agua destilada	Agua destilada
Ampicilina <sup>a</sup>	Pfizer	Tampón fosfato 0,1 M, pH8	Tampón fosfato 0,1M, pH 6. Agua destilada
Sulbactam	Pfizer	Agua destilada	Agua destilada
Piperacilina	Cyanamid. Lederle	Agua destilada	Agua destilada
Tazobactam	Cyanamid. Lederle	Agua destilada	Agua destilada

<sup>a</sup> Se utiliza como diluyente agua destilada a partir de la primera dilución 1= 10 con tampón fosfato pH6.

## **METODOS**

## DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PENICILINASA

La producción de penicilinasa fue detectada por el método de la cefalosporina cromógena (84), basado en el cambio de color que se produce como resultado de la hidrólisis del anillo betalactámico de una cefalosporina cromógena, nitrocefina (Glaxo. Ltd.), por la acción de la betalactamasa.

Se preparó una suspensión densa del microorganismo en 1 ml de solución salina a la que se añadieron 100  $\mu$ l del sustrato cromógeno. Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad. Transcurrido este tiempo se procedió a la lectura. Si el microorganismo era productor de betalactamasa, el color del medio habría virado a rojo, mientras que si no la producía, el color del medio permanecería amarillo.

En la realización de la prueba se incluyó como control positivo S.aureus ATCC 6538P (productor de penicilinasa) y como control negativo S.aureus ATCC 25923 (no productor de penicilinasa).

## DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria a las 2 cepas de S.aureus, se utilizó el método macrodilución en caldo (85).

Se prepararon tubos con 1 ml de caldo de Mueller Hinton suplementado con  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$  conteniendo concentraciones en base 2 de los distintos antimicrobianos y sus correspondientes combinaciones, con un rango para amoxicilina, ampicilina y piperacilina de 0,06 - 256 mg/l, de 0,25 - 128 mg/l para ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam y de 0,015 - 16 mg/l para las combinaciones de amoxicilina - ácido clavulánico, ampicilina-sulbactam y piperacilina-tazobactam.

El inóculo bacteriano se preparó siguiendo el método estándar ( $10^5$  a  $10^6$  ufc/ml) (86) y posteriormente se diluyó al 1: 200 en caldo. Se añadió 1 ml del inóculo a cada tubo con antimicrobiano. Como control del adecuado crecimiento de las cepas se incluyeron tubos de caldo sin antimicrobiano. Igualmente se incluyeron controles de esterilidad del medio líquido y de los antimicrobianos. Además, una porción de la suspensión bacteriana se pipeteó en una placa de Agar Mueller Hinton, extendiéndose en forma de aislamiento para observar la pureza del inóculo.

Todos los tubos y las placas de control de pureza del inóculo se incubaron a  $35^{\circ}\text{C}$  durante 18 horas.

La concentración mínima inhibitoria se define como la menor concentración de antimicrobiano que determina una inhibición completa de crecimiento visible en el medio de cultivo tras 18 horas de incubación a  $35^{\circ}\text{C}$ .

## **FAGOCITOSIS EN SUSPENSIÓN DE BACTERIAS MARCADAS CON ISÓTOPOS RADIOACTIVOS POR LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES HUMANOS**

### **Marcaje de bacterias**

Se inocularon  $50\ \mu\text{l}$  de una suspensión del microorganismo (10-12 colonias en 3 ml de PBS) en 5 ml de caldo de Mueller Hinton. El marcaje radioactivo de las bacterias se realizó añadiendo  $10\ \mu\text{l}$  de 2-3H adenina (de actividad específica 24 Ci/mmol). Se incubó en estufa a  $35^{\circ}\text{C}$  con agitación durante 18 horas.

Se efectuaron 3 lavados de las bacterias con tampón fosfato salino pH 7,2 y se resuspendieron en el mismo tampón, ajustándose a una densidad óptica de 0,265 en un espectrofotómetro Spectronic 501 (Bausch & Lomb USA) a una longitud de onda de 520 nm, que correspondía aproximadamente

a  $2,5 \times 10^8$  ufc/ml, comprobado por recuento de colonias. Las suspensiones bacterianas se mantuvieron a  $4^\circ\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

### **Aislamiento de leucocitos polimorfonucleares**

Para el aislamiento de los leucocitos polimorfonucleares se utilizó el método de Böyum modificado (87).

Se mezclaron suavemente 10 ml de sangre fresca venosa heparinizada de adulto sano con 3 ml de solución de dextrano al 6% en suero fisiológico. Se dejó la mezcla durante 40 minutos a temperatura ambiente para permitir la sedimentación de los eritrocitos. Posteriormente el plasma rico en leucocitos se depositó suavemente en tubos que contenían 3 ml de Ficoll-Paque (volumen de plasma por tubo de 8 ml), evitando que se mezclasen ambas capas, y se centrifugaron durante 35 minutos a 1200 rpm a  $18^\circ\text{C}$ . Se obtenía así una capa en la interfase plasma-Ficoll formada por las células mononucleares y un sedimento en el fondo de cada tubo constituido por los polinucleares y eritrocitos residuales, separados por gradiente de densidad. Se descartó el sobrenadante con pipeta Pasteur, comenzando por la capa de mononucleares y continuando con las de Ficoll y plasma sucesivamente.

Para lisar los eritrocitos residuales se mezclaron los botones de PMN-hematíes con 10 ml de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  al 0,85% en agua destilada en un rotor durante 10 minutos, centrifugándolos posteriormente durante 10 minutos a 800 rpm a  $4^\circ\text{C}$ . Se descartó el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y se resuspendieron los botones celulares en GHBSS. Finalmente se lavaron dos veces más y se resuspendieron en GHBSS.

El recuento se realizó por método hemocitométrico, utilizando una cámara de Bürker-Türk (Schreck-Hofheim, Germany). La suspensión final se ajustó a  $5 \times 10^6$  ó  $2,5 \times 10^6$  PMN/ml, según el experimento que se fuese a realizar.

Después de cada aislamiento se comprobó la viabilidad celular mediante tinción con azul tripán, siendo ésta superior al 95% en todos los casos.

Las células se mantuvieron a 4°C hasta el momento de su utilización. Durante todo el procesamiento de las células se utilizó material plástico.

### **Opsonización de bacterias**

Para la opsonización se depositaron en viales de polipropileno (Biovials Beckman, Chicago, II. USA) 0,1 ml de cada suspensión bacteriana ( $2,5 \times 10^8$  ufc / ml) y 0,4 ml de una solución de mezcla de sueros humanos (HPS) al 5% en GHBSS. Los bioviales se incubaron en baño de agitación a 37°C durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo de opsonización se detuvo el proceso mediante la adición de 2 ml de PBS a 4°C, se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las bacterias en 0,5 ml de GHBSS, obteniéndose una concentración final de  $5 \times 10^7$  ufc / ml opsonizadas.

Se utilizaron siempre controles negativos, sustituyendo el suero por GHBSS como fuente opsónica.

### **Técnica de fagocitosis en suspensión**

Con esta técnica se estudia cuantitativamente la ingestión por leucocitos polimorfonucleares de bacterias marcadas con isótopos radioactivos, lo que permite expresar los valores de fagocitosis en función de la radioactividad asociada a los fagocitos.

Se utilizó una ligera modificación (88) de la técnica descrita previamente por Verhoef y cols. (89). En viales de polipropileno (Biovials Beckman, Chicago, II. USA) se dispensaron 0,1 ml de la suspensión de PMN ( $5 \times 10^6$  PMN/ml.) y

0,1 ml de la suspensión de bacterias opsonizadas o no ( $5 \times 10^7$  bacterias/ml), a una razón PMN/bacterias de 1/10, cada experimento se realizó por duplicado ( $T_1$  y  $T_2$  en la figura 4).

Las mezclas se incubaron en baño de agitación a  $37^\circ\text{C}$ . Tras 12 minutos de incubación se detuvo la fagocitosis mediante la adición a cada vial de 2,5 ml de PBS a  $4^\circ\text{C}$ . Los viales se centrifugaron a 700 rpm durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$  y los sedimentos celulares se lavaron tres veces con 2,5 ml de PBS a  $4^\circ\text{C}$ , centrifugando a igual velocidad durante 5 minutos. De esta forma se eliminaron las bacterias no fagocitadas por gradiente de velocidad.

Al sedimento final, conteniendo las bacterias fagocitadas por leucocitos, se le añadieron 2,5 ml de líquido de centelleo, se agitó y se realizó la lectura en un contador beta de centelleo líquido (Beckman LS 1701. Beckman Instrument, Inc. USA). Esto correspondería a la radioactividad asociada a los leucocitos, o lo que es lo mismo, la correspondiente a las bacterias fagocitadas.

Para determinar la radioactividad total añadida a los viales (RT en la figura 4), en un vial aparte se dispensaron 0,1 ml de bacterias opsonizadas o no y se añadieron 2,5 ml de líquido de centelleo.

Para conocer la eficacia del marcaje (EM), o sea el número de bacterias que correspondería a una desintegración por minuto (dpm), a 0,1 ml de la suspensión inicial de bacterias, antes de ser sometidas al proceso de opsonización, se les añadió el líquido de centelleo y se realizó el contaje. El número de dpm obtenido se multiplicó por 10 y así obtendríamos el número de dpm/ml de suspensión bacteriana. Como sabíamos que había  $5 \times 10^8$  bacterias /ml, aplicamos la siguiente fórmula:



$$EM \text{ (nº bacterias / dpm)} = \frac{32}{5 \times 10^8} \times 10 \times A$$

A= dpm correspondientes a 100  $\mu$ l de la suspensión inicial de bacterias.

El porcentaje de fagocitosis fue calculado por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Fagocitosis} = \frac{\text{dpm asociadas a leucocitos}}{\text{dpm de radioactividad total}} \times 100 =$$

$$= \frac{\text{dpm} \frac{T_1 + T_2}{2}}{\text{dpm RT}} \times 100$$

La técnica de fagocitosis de bacterias en suspensión fue empleada para estudiar el efecto de la preincubación de S. aureus con concentraciones subinhibitorias de antimicrobiano sobre la fagocitosis por polimorfonucleares neutrófilos, así como para conocer si los antibióticos tenían algún efecto directo sobre la capacidad fagocítica de estas células.

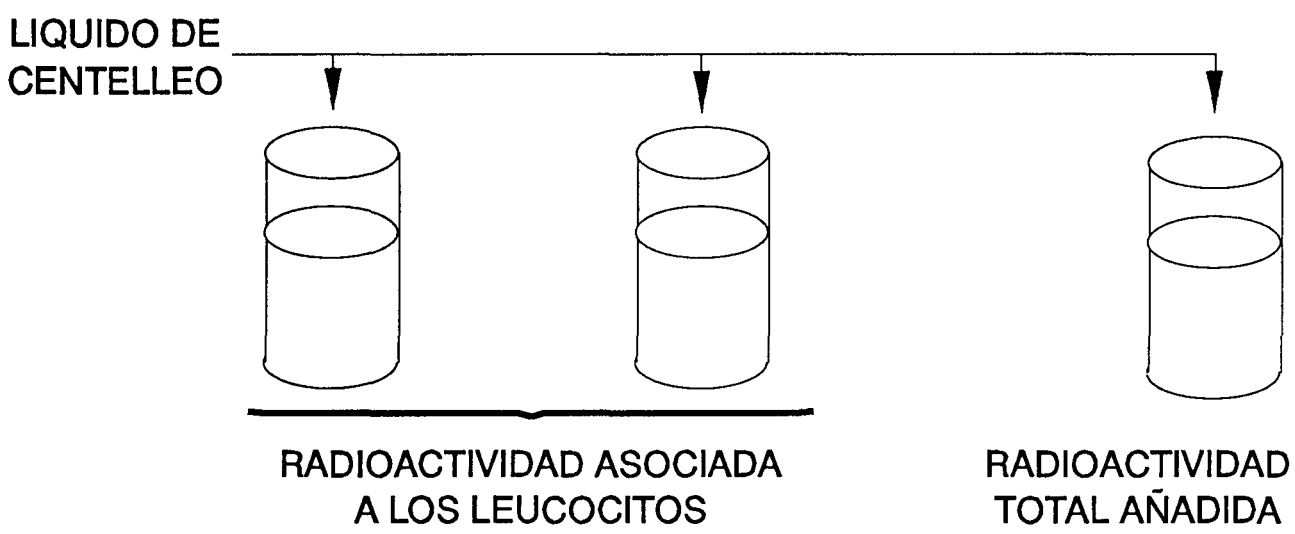
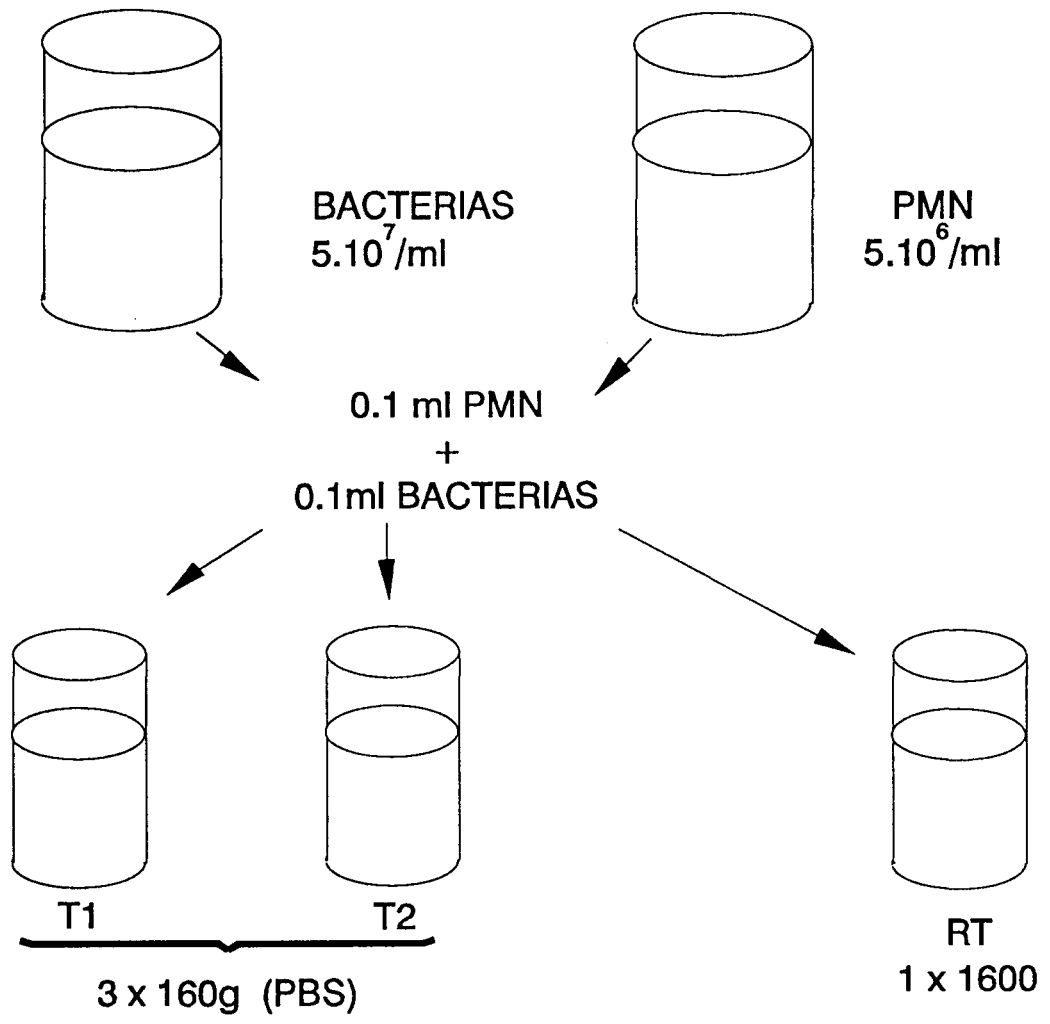


Figura 4.- Técnica de fagocitosis en suspensión.

## **Efecto de la preincubación de S. aureus con concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos sobre la fagocitosis por PMN**

Para estudiar este efecto el proceso de marcaje de las bacterias se realizó en tubos conteniendo 5 ml de caldo de Mueller Hinton a los que se adicionó cada antimicrobiano a una concentración correspondiente a 1/4 de la CMI para la cepa a estudiar.

Cada experimento se realizó por duplicado en tres días diferentes empleando PMN de distintos donantes.

## **Efecto de los antimicrobianos sobre la capacidad fagocítica de los PMN**

Para conocer si los antimicrobianos estudiados tenían algún efecto directo sobre la capacidad fagocítica de los PMN se incubaron dichas células con distintas concentraciones de los antimicrobianos antes de llevar a cabo el ensayo de la fagocitosis de bacterias en suspensión.

Las concentraciones de antimicrobiano ensayadas fueron 1, 10 y 100 mg/l La incubación se realizó en baño de agitación durante 30 minutos a 37°C.

Cada ensayo se realizó por duplicado con PMN de 3 donantes diferentes.

## **EFEECTO DE LOS ANTIMICROBIANOS EN LOS MECANISMOS BACTERICIDAS DEPENDIENTES DEL OXÍGENO DE LOS POLIMORFONUCLEARES NEUTROFICOS**

Al objeto de conocer si los antimicrobianos estudiados tenían alguna influencia en los mecanismos bactericidas dependientes del oxígeno de los PMN, se midió la producción de radicales superóxido ( $O_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por dichas células tras exponerlas a distintas concentraciones de

los antimicrobianos (1, 10 y 100 mg/l), incluyendo en cada experimento viales conteniendo células no expuestas a antimicrobiano.

El aislamiento de los PMN se realizó siguiendo la técnica descrita en el apartado anterior.

### Producción de radicales superóxido ( $O_2^-$ )

La producción de radicales  $O_2^-$  se determinó utilizando una modificación del microensayo de reducción del ferricitocromo C descrito por Pick y Mizel (90).

En el proceso de reducción del ferricitocromo C, el  $O_2^-$  sirve como dador de electrones. La cantidad de citocromo C reducido, proporcional a la cantidad de  $O_2^-$  lanzada al medio por los PMN estimulados, fue determinada midiendo el incremento de su absorbancia a 550 nm. La prueba de que la reducción del citocromo C era debida a la cesión de electrones por parte del  $O_2^-$  venía dada por el hecho de que dicha reducción era eliminada cuando se incluía en la mezcla de la reacción superóxido dismutasa (SOD).

Inicialmente se dispensaron alícuotas con  $2,5 \times 10^6$  PMN en 130  $\mu$ l de GHBS con o sin antimicrobiano en los pocillos de placas de microdilución de 96 pocillos y fondo plano (Flow Laboratories. USA). La mitad de las suspensiones celulares contenían 60 unidades de SOD. Las placas fueron incubadas durante 30 minutos a 37°C en atmósfera de  $CO_2$  al 5%. A continuación se añadió a la mitad de los pocillos 70  $\mu$ l de una suspensión que contenía el estímulo, acetato de forbol miristato (PMA) a una concentración final de 200 nM, y 60 unidades de citocromo C. En los pocillos restantes, sin estímulo, se añadieron 70  $\mu$ l de GHBS conteniendo 60 U de citocromo C. Las placas se incubaron a 37°C durante 60 minutos. Transcurrido este tiempo se procedió a la lectura de la absorbancia a 550 nm en un fotómetro Multiskan MC (Flow

Laboratories, USA). La cantidad de  $O_2^-$  producida se expresó en nmoles de  $O_2^-$ /mg de proteína.

El contenido proteico de los PMN se determinó por el método de Lowry y colaboradores (91).

Todos los ensayos se realizaron por triplicado con PMN de 5 donantes distintos.

### Producción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )

Para medir la producción de  $H_2O_2$  por los PMN se utilizó una modificación de la técnica del rojo fenol (90). Esta técnica se basa en la conversión del rojo fenol por el  $H_2O_2$ , dependiente de la peroxidasa de rábano picante (HRPO), en un compuesto con mayor absorbancia a 600-610 nm. El ensayo es leído después de llevar el pH de la mezcla a 12,5, al objeto de eliminar cambios en la absorbancia del rojo fenol debidos a su carácter de indicador de pH.

El ensayo se realizó en placas de microdilución como las descritas en el caso de la producción de  $O_2^-$ . La concentración de células empleadas fue de  $5 \times 10^6$  PMN/ml. Como estímulo se usó PMA (200 nM). Se utilizó una solución de rojo fenol (PRS) constituida por peroxidasa de rábano picante a una concentración 100 U/ml y rojo fenol, sal sódica, 0,72 mg/ml, en una proporción 2/7. Las placas se incubaron a 37°C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se paró la reacción con NaOH 3M y se procedió a la lectura de la absorbancia a 610 nm en un fotómetro Multiskan MC (Flow Laboratories, USA).

Para poder expresar los resultados en términos de nmoles de  $H_2O_2$ /mg proteína celular, se realizó en cada experimento una curva estándar, usando diluciones de una solución de  $H_2O_2$  de molaridad conocida, mezcladas con PRS, alcanzando concentraciones finales de  $H_2O_2$  por pocillo de 1 a 50  $\mu$ M. Después de 10 minutos de incubación a 37°C se les añadió NaOH

3M, leyendo la absorbancia a 610 nm.

Cada experimento se realizó por cuadruplicado en cuatro días diferentes con PMN de distintos donantes.

#### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INTRACELULAR DE LOS ANTIMICROBIANOS

Para evaluar la actividad intracelular de los antimicrobianos, se utilizó el método descrito previamente por Pascual y colaboradores (92).

En una serie de viales de polipropileno se dispensaron 0,1 ml de una suspensión de bacterias opsonizadas con HPS al 5% en GHBSS ( $5 \times 10^7$  ufc/ml) y 0,1 ml de PMN ( $5 \times 10^6$  células / ml) Se incubaron en agitación (250 rpm) durante 60 minutos a 37°C.

Transcurrido este tiempo, las bacterias extracelulares fueron eliminadas por centrifugación diferencial (3 ciclos de 10 minutos a 800 rpm), y las células fueron resuspendidas en 200  $\mu$ l de RPMI suplementado con suero bovino fetal al 1%.

En este instante, tiempo cero, se adicionaron los antimicrobianos a las concentraciones adecuadas (1, 10 y 100 mg/l) o GBHSS (controles) y los viales fueron incubados en agitación (250 rpm) a 37°C.

A los 180 minutos se retiraron viales control y con las distintas concentraciones de antimicrobiano. En el tiempo cero también se retiró un vial (control tiempo cero).

Una vez retirados los viales, se lavaron las mezclas celulares con PBS y se procedió a la ruptura de las células por choque osmolar con H<sub>2</sub>O destilada. Se diluyeron las diferentes muestras y se inocularon en placas de Agar Mueller Hinton que

se incubaron durante 48 horas a 37°C. Los valores se expresaron como porcentaje de supervivencia, tomando como referencia el control del tiempo cero.

Además, con objeto de evaluar la disposición bacteriana, asociada a las células o intracelular, en cada período (0, 180 minutos) se efectuó un control microbiológico. Para ello se depositó una muestra de 50  $\mu$ l en un portaobjetos, se realizó una tinción de Wright y se observó por microscopía óptica.

Todos los ensayos se realizaron por duplicado utilizando PMN de 4 donantes distintos.

#### **ANALISIS ESTADISTICO**

Todos los datos se expresaron como media aritmética +/- desviación estándar. El test estadístico utilizado fue el de la T de Student, considerando valores de  $p \leq 0,05$  como estadísticamente significativos.

## **RESULTADOS**



**SENSIBILIDAD DE S.AUREUS A LOS ANTIMICROBIANOS EVALUADOS**

La concentración mínima inhibitoria de los seis antimicrobianos incluidos en este estudio, y sus diferentes combinaciones para las cepas de S. aureus productora y no productora de penicilinas se muestra en las Tablas III, IV y V.

Acido clavulánico fue el inhibidor de betalactamasas que mostró mayor actividad intrínseca (CMI: 16 mg/l para las dos cepas), siendo sulbactam el menos activo (CMI: 128 mg/l).

Todas las combinaciones betalactámico/inhibidor de betalactamasas se mostraron eficaces frente a la cepa productora de penicilinas, reduciendo los valores de CMI para las 3 aminopenicilinas a niveles considerados como sensibles. En el caso de las combinaciones amoxicilina/ácido clavulánico y ampicilina/sulbactam, se observó que al aumentar la proporción del inhibidor de betalactamasas en la asociación se producía un aumento de la sensibilidad a amoxicilina y ampicilina respectivamente.

En el caso de la cepa no productora de penicilinas, los valores de CMI de las aminopenicilinas estudiadas no se modificaron prácticamente al asociarles un inhibidor de betalactamasas.



Tabla III: Concentración mínima inhibitoria (mg/l) de amoxicilina (AMX), ácido clavulánico (CLAV) y diferentes combinaciones de amoxicilina/ácido clavulánico (AMX/CLAV) para las cepas de S. aureus productora (SAPP) y no productora de penicilinasas (SANPP).

	AMX	CLAV	AMX/CLAV			
			4/1	1/1	1/8	1/32
SAPP	64	16	1	0,5	0,25	0,125
SANPP	0,125	16	0,06	0,06	0,06	0,06

Tabla IV: Concentración mínima inhibitoria (mg/l) de ampicilina (AMP), sulbactam (SBT) y diferentes combinaciones de ampicilina/sulbactam (AMP/SBT) para las cepas de S. aureus productora (SAPP) y no productora de penicilinas (SANPP).

	AMP	SBT	AMP/SBT				
			2/1	1/1	1/4	1/8	1/32
SAPP	128	128	4	2	1	0,5	0,25
SANPP	0,125	128	0,25	0,25	0,25	0,125	0,125

Tabla V: Concentración mínima inhibitoria (mg/l) de piperacilina (PIP), tazobactam (TZB) y la combinación piperacilina/tazobactam (8/1) (PIP/TZB) para las cepas de S. aureus productora (SAPP) y no productora de penicilinas (SANPP).

	PIP	TZB	PIP/TZB
SAPP	64	32	1
SANPP	0,25	32	0,25

INFLUENCIA DE AMOXICILINA Y ACIDO CLAVULANICO, SOLOS O COMBINADOS, SOBRE LAS FUNCIONES DE LOS PMN HUMANOS.

Efecto de la preincubación bacteriana con concentraciones subinhibitorias de los antimicrobianos en la opsonización y fagocitosis de S.aureus por los PMN.

El efecto de la exposición durante 18 horas de la cepa de S. aureus no productora de penicilinas a 0,25 CMI de amoxicilina y ácido clavulánico, sobre la fagocitosis de la misma por los PMN se muestra en la figura 5. Como se puede observar, el porcentaje de fagocitosis de las bacterias expuestas a amoxicilina y a ácido clavulánico fue significativamente más alto que el del control (bacterias no expuestas a antimicrobiano), tanto en bacterias opsonizadas como sin opsonizar. El mayor incremento se observó con ácido clavulánico en bacterias sin opsonizar, obteniéndose un valor de  $70,6 \pm 7,3$  ( $X \pm SEM$ ), en comparación con el del control, que fue de  $5,3 \pm 3,3$ . Al estudiar la cepa de S. aureus productora de penicilinas (figura 6), únicamente la preincubación con 0,25 CMI de ácido clavulánico determinó un incremento significativo en la ingestión por los PMN de bacterias no opsonizadas (% de fagocitosis:  $24 \pm 2,6$  ( $X \pm SEM$ ) en comparación con  $7,3 \pm 2,6$  del control).

Al objeto de estudiar el efecto de ambos antimicrobianos combinados en la fagocitosis de S.aureus, las dos cepas fueron expuestas durante 18 horas a la cuarta parte de la concentración mínima inhibitoria (0,25 CMI) de diferentes combinaciones de amoxicilina/ácido clavulánico, conteniendo proporciones crecientes del inhibidor de betalactamasas. Las proporciones de las combinaciones de amoxicilina/ácido clavulánico ensayadas fueron de 4/1, 1/1, 1/8 y 1/32. Los resultados quedan reflejados en las figuras 7 y 8. En el caso de la cepa no productora de penicilinas (figura 7), la exposición de las bacterias a 0,25 CMI de las diferentes

combinaciones de amoxicilina/ácido clavulánico determinó un aumento significativo en la ingestión por los PMN. Los porcentajes de fagocitosis más altos se obtuvieron con aquellas combinaciones en las que ácido clavulánico se encontraba en mayor proporción (1/8 y 1/32). Con la cepa productora de penicilinasa, sin embargo, no se observó ningún efecto significativo en la fagocitosis por los PMN humanos de las bacterias previamente expuestas a las distintas combinaciones de amoxicilina/ácido clavulánico (figura 8).

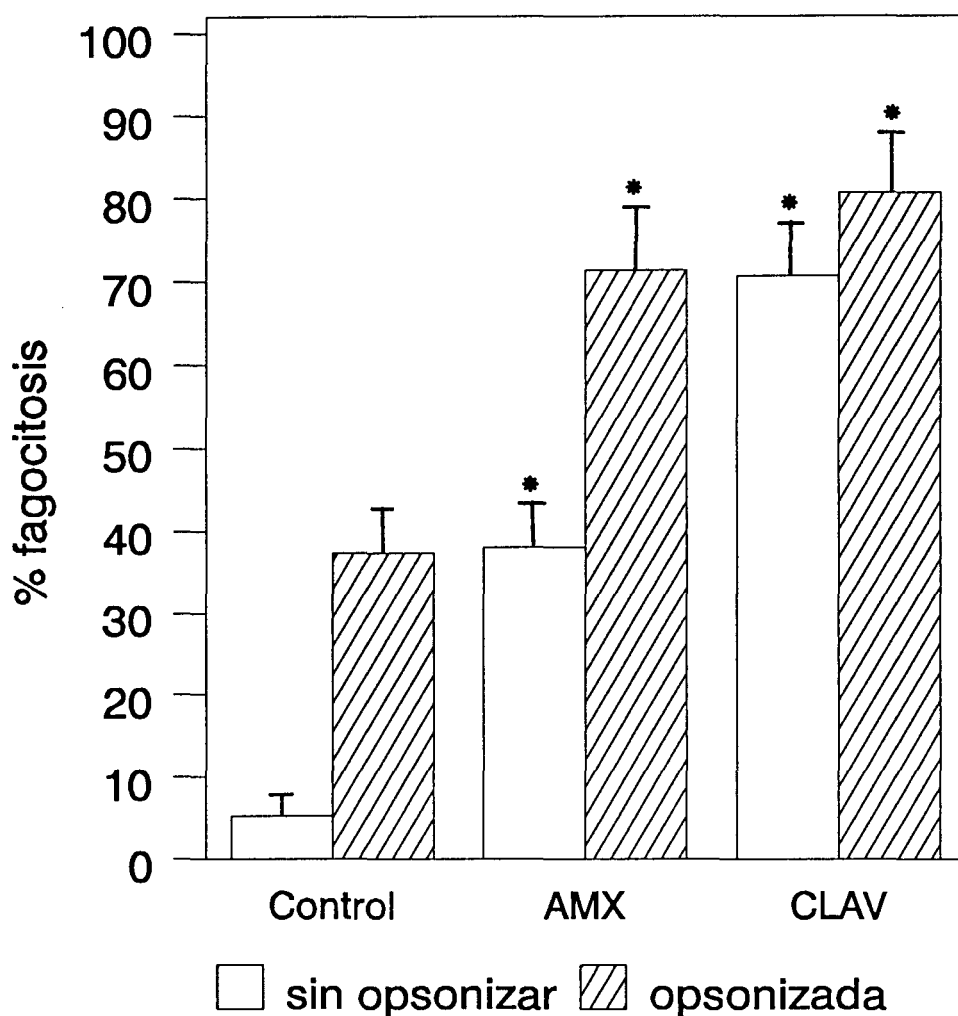
El distinto efecto observado en la ingestión por los PMN tras exponer ambas cepas a diferentes combinaciones de amoxicilina/ácido clavulánico, estimulador en el caso de la cepa no productora de penicilinasa e indiferente en el caso de la cepa productora, nos hizo pensar en la posibilidad de que durante un tiempo de incubación tan largo, 18 horas, ácido clavulánico, en concentraciones tan bajas, sería rápidamente destruido por la penicilinasa estafilocócica, no pudiendo así actuar ni como inactivador de betalactamasas, protegiendo a amoxicilina, ni directamente sobre la bacteria. Al objeto de comprobar si esto era cierto, decidimos realizar otra serie de experimentos, con las mismas condiciones, pero reduciendo el tiempo de exposición a 4 horas.

Los valores de fagocitosis obtenidos con la cepa no productora de betalactamasa tras exponerla a 0,25 CMI de amoxicilina y ácido clavulánico durante 4 horas se muestran en la figura 9. Como se puede observar, el porcentaje de fagocitosis obtenido en el caso de las bacterias tratadas con concentraciones subinhibitorias de amoxicilina fue muy similar al del control, tanto con bacterias no opsonizadas (% de fagocitosis:  $14 \pm 4$  para las bacterias expuestas a amoxicilina y  $11 \pm 3$  en el caso del control), como opsonizadas (% de fagocitosis:  $47 \pm 13$  para las bacterias tratadas con amoxicilina frente a  $45 \pm 11$  del control). Cuando las bacterias habían sido previamente tratadas con 0,25 CMI de ácido clavulánico, el porcentaje de fagocitosis de bacterias no

opsonizadas fue significativamente más alto ( $24 \pm 5$ ) que el del control, mientras que en el caso de bacterias opsonizadas, aunque se obtuvo un valor más alto ( $60 \pm 13$ ), no fue estadísticamente significativo .

En la figura 11 se muestran los porcentajes de fagocitosis obtenidos con la cepa no productora de penicilinas tras exponerla durante 4 horas a las distintas combinaciones de betalactámico/inhibidor de betalactamasas. En todos los casos, la fagocitosis se vio incrementada con respecto al control (% fagocitosis:  $15 \pm 3$  cuando las bacterias no habían sido opsonizadas y  $45 \pm 7$  cuando habían sido opsonizadas con HPS al 5%), pero sólo de forma significativa para las combinaciones 1/8 y 1/32, tanto en bacterias no opsonizadas (% de fagocitosis:  $25,5 \pm 5$  y  $30 \pm 6$  respectivamente), como opsonizadas (% de fagocitosis:  $64 \pm 6$  y  $65 \pm 10$  respectivamente).

Tras exponer la cepa de S. aureus productora de penicilinas a 0,25 CMI de amoxicilina y ácido clavulánico durante 4 horas, los porcentajes de fagocitosis obtenidos (figura 10) fueron semejantes a los que se obtuvieron con bacterias no tratadas. Sin embargo, la exposición a diferentes combinaciones de amoxicilina/ácido clavulánico, determinó un incremento significativo en la fagocitosis de bacterias opsonizadas, con aquellas combinaciones en las que ácido clavulánico se encontraba en mayor proporción (1/1, 1/8 y 1/32) (figura 12).

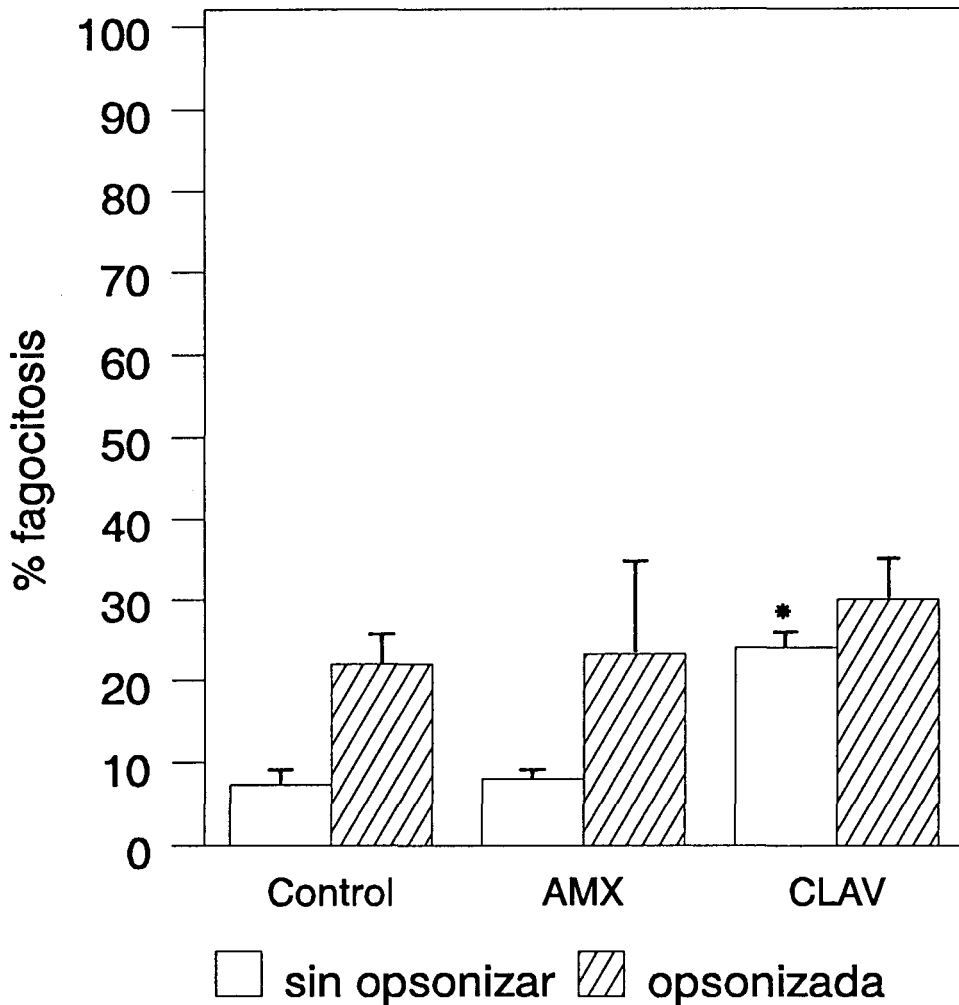
**Figura 5:**

Efecto de la exposición de la cepa de *S. aureus* no productora de penicilinas durante 18 horas a 0,25 CMI de amoxicilina (AMX) y ácido clavulánico (CLAV) en su fagocitosis por PMN humanos (n=5).  
Tiempo de fagocitosis: 12 minutos.

Control: bacterias no expuestas.

\*  $p < 0,05$



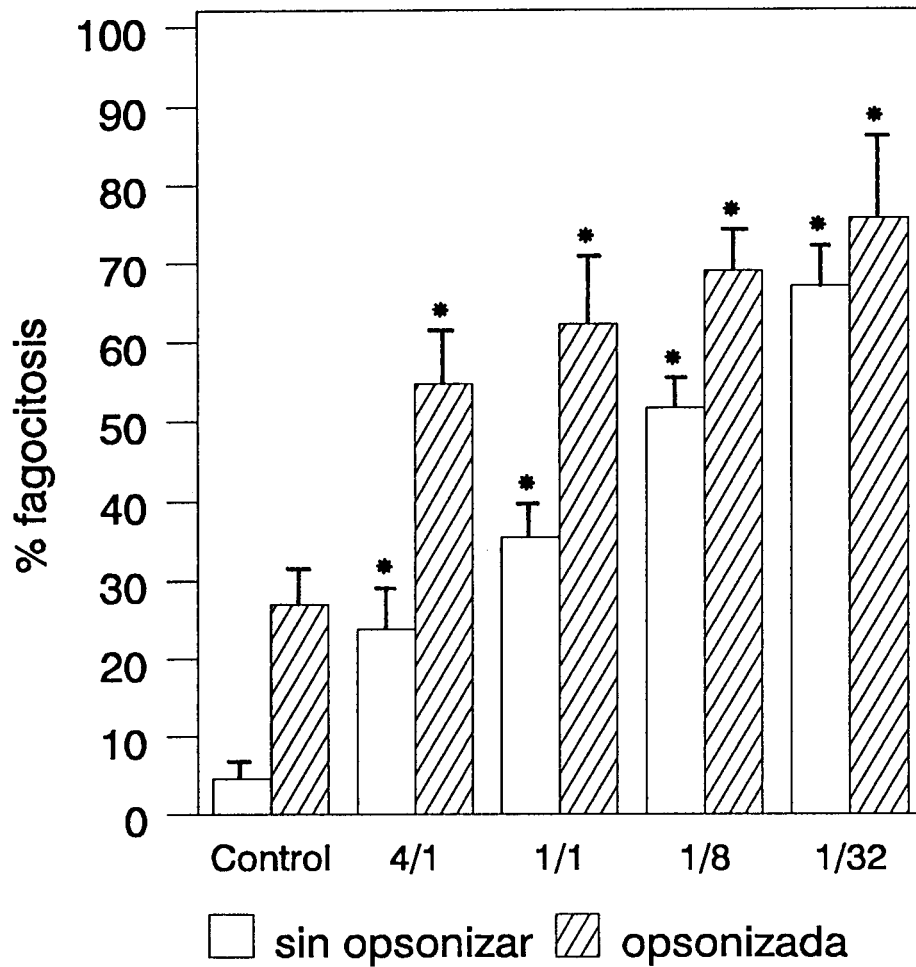
**Figura 6:**

Efecto de la exposición de la cepa de *S. aureus* productora de penicilina durante 18 horas a 0,25 CMI de amoxicilina (AMX) y ácido clavulánico (CLAV) en su fagocitosis por PMN humanos (n=5).

Tiempo de fagocitosis: 12 minutos.

Control: bacterias no expuestas.

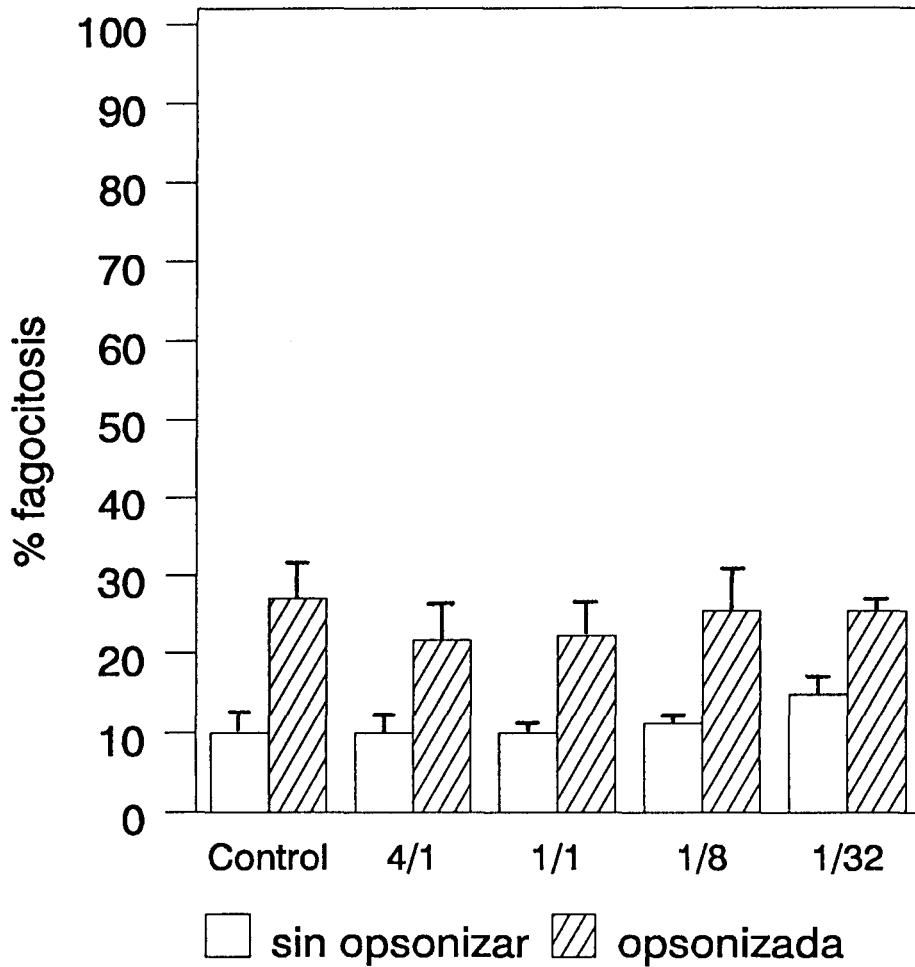
\*  $p < 0,05$



### Figura 7:

Efecto de la exposición de la cepa de *S. aureus* no productora de penicilinas durante 18 horas a 0,25 de CMI de diferentes combinaciones de amoxicilina/ácido clavulánico (4/1, 1/1, 1/8 y 1/32) en su fagocitosis por PMN humanos (n=5). Tiempo de fagocitosis: 12 minutos. Control: bacterias no expuestas.

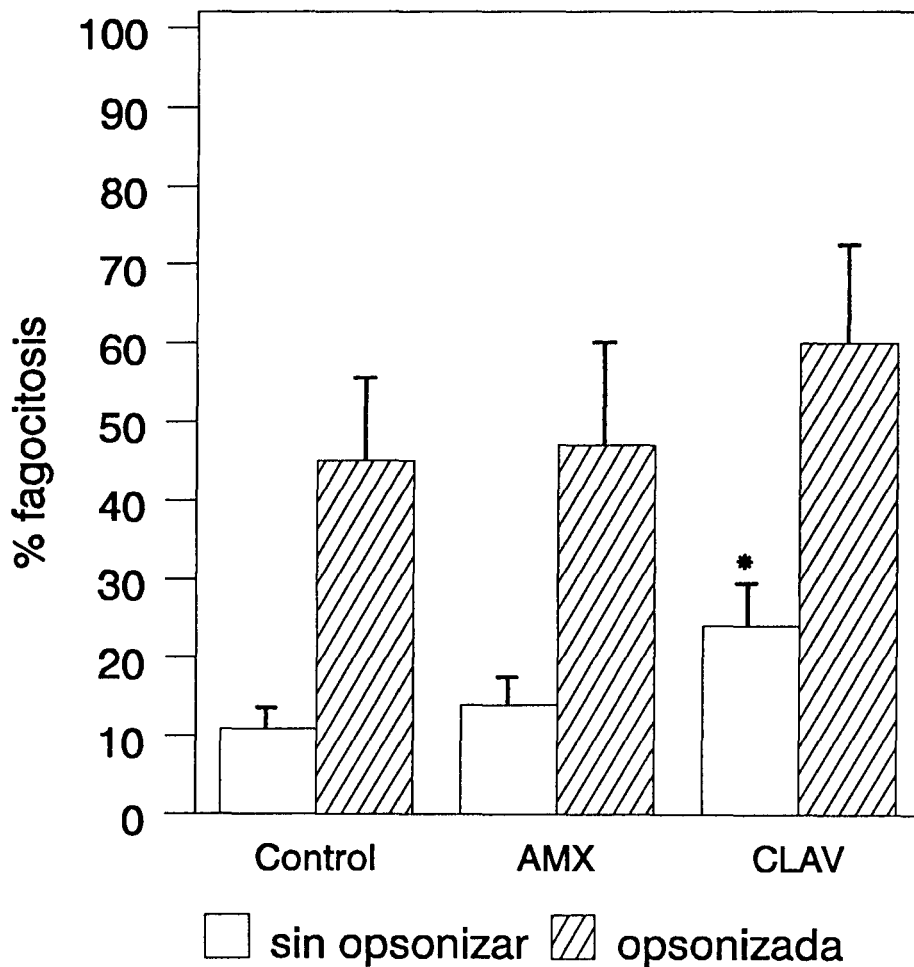
\*  $p < 0,05$

**Figura 8:**

Efecto de la exposición de la cepa de *S. aureus* productora de penicilinas durante 18 horas a 0,25 CMI de diferentes combinaciones de amoxicilina/ácido clavulánico (4/1, 1/1, 1/8 y 1/32) en su fagocitosis por PMN humanos (n=5). Tiempo de fagocitosis: 12 minutos.

Control: bacterias no expuestas.

\*  $p < 0,05$

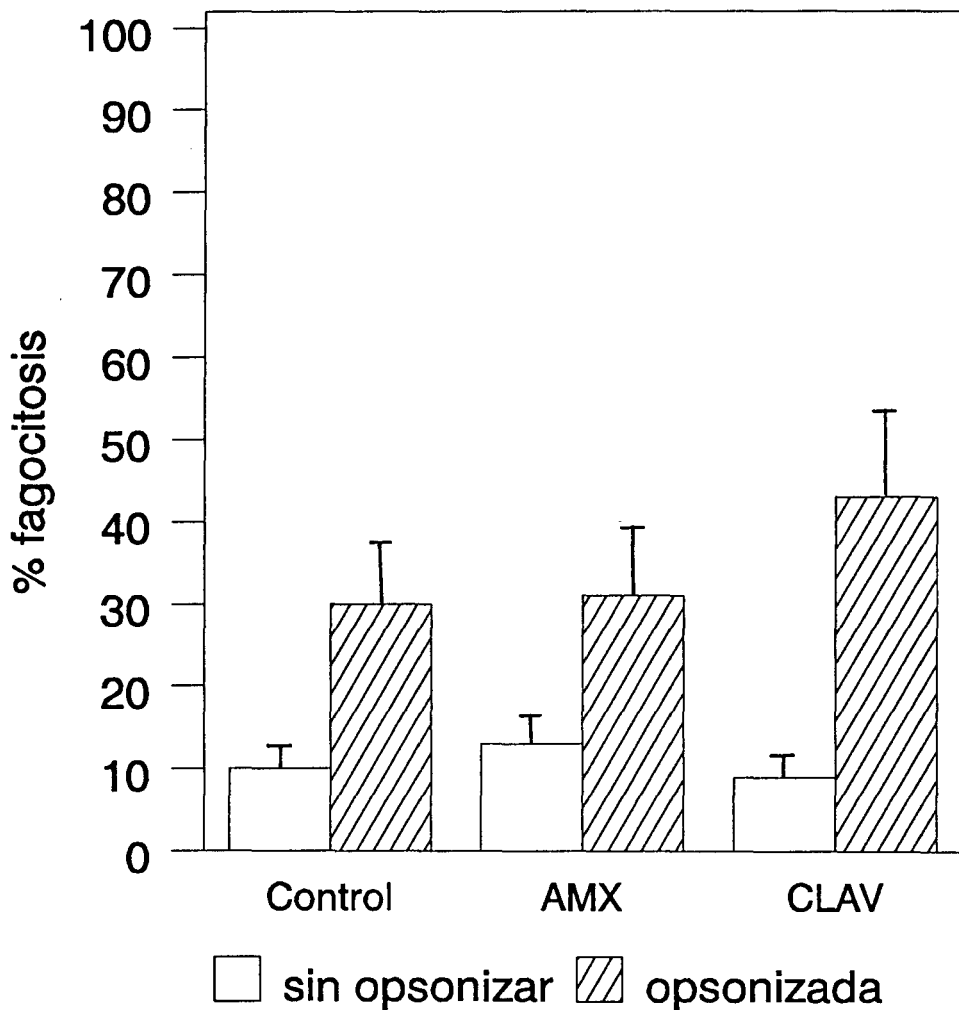
**Figura 9:**

Efecto de la exposición de la cepa de *S. aureus* no productora de penicilinas durante 4 horas a 0,25 CMI de amoxicilina (AMX) y ácido clavulánico (CLAV) en su fagocitosis por PMN humanos (n=4).

Tiempo de fagocitosis: 12 minutos.

Control: bacterias no expuestas.

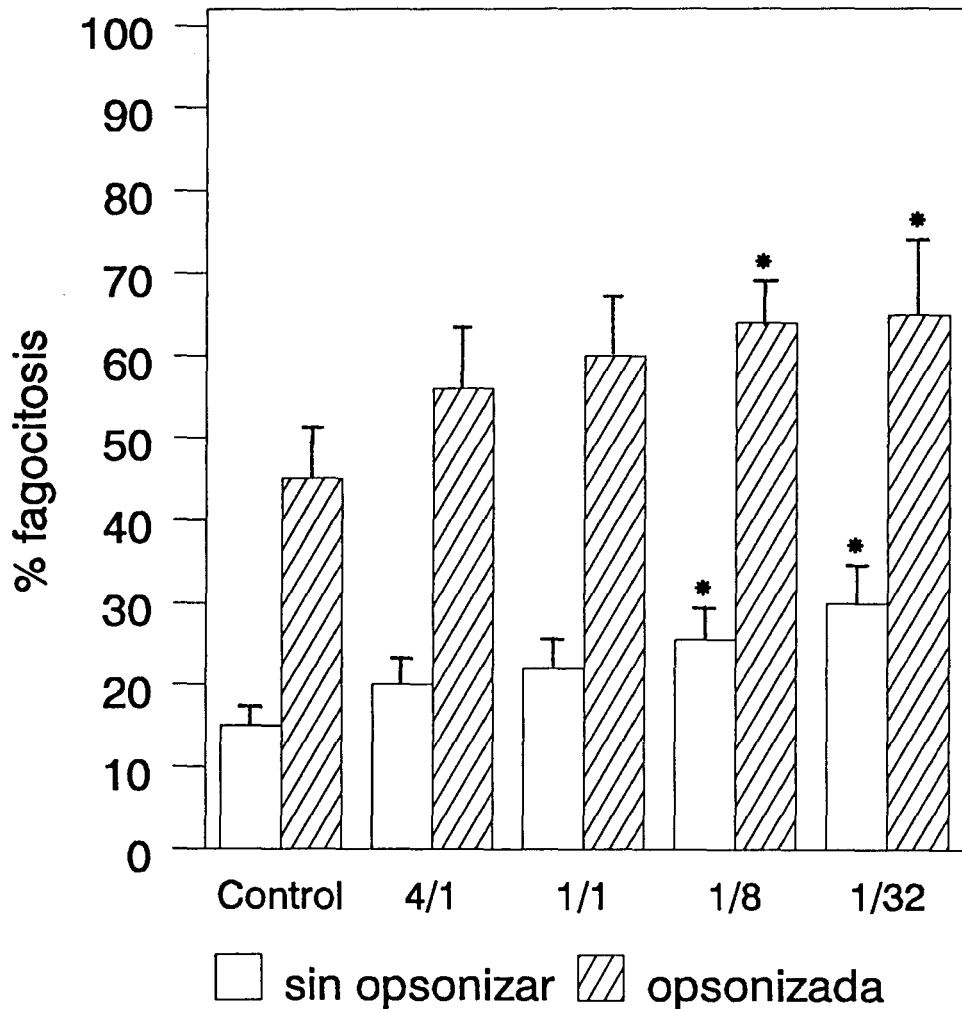
\*  $p < 0,05$

**Figura 10:**

Efecto de la exposición de la cepa de *S. aureus* productora de penicilina durante 4 horas a 0,25 CMI de amoxicilina (AMX) y ácido clavulánico (CLAV) en su fagocitosis por PMN humanos (n=4).  
Tiempo de fagocitosis: 12 minutos.

Control: bacterias no expuestas.

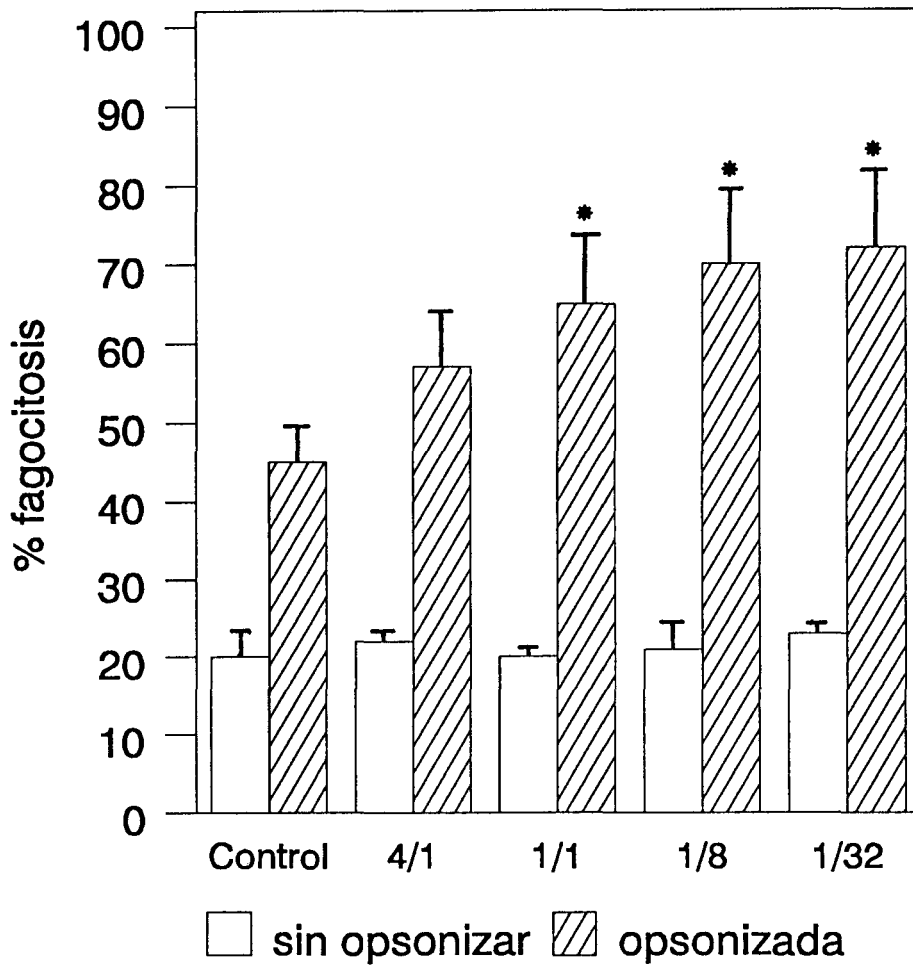
\*  $p < 0,05$



### Figura 11:

Efecto de la exposición de la cepa de *S. aureus* no productora de penicilinas durante 4 horas a 0,25 CMI de diferentes combinaciones de amoxicilina/ácido clavulánico (4/1, 1/1, 1/8 y 1/32) en su fagocitosis por PMN humanos (n=4). Tiempo de fagocitosis: 12 minutos. Control: bacterias no expuestas.

\*  $p < 0,05$

**Figura 12:**

Efecto de la exposición de la cepa de *S. aureus* productora de penicilinas durante 4 horas a 0,25 de CMI de diferentes combinaciones de amoxicilina/ácido clavulánico (4/1, 1/1, 1/8 y 1/32) en su fagocitosis por PMN humanos (n=4). Tiempo de fagocitosis: 12 minutos.

Control: bacterias no expuestas.

\*  $p < 0,05$

Influencia directa de los antimicrobianos sobre la capacidad fagocítica y los mecanismos bactericidas dependientes del oxígeno de los PMN.

1. Efecto directo de los antimicrobianos sobre la capacidad fagocítica de los PMN.

Para evaluar este efecto se preincubaron los PMN humanos con un amplio rango de concentraciones (1, 10 y 100 mg/l) de amoxicilina, ácido clavulánico y la combinación amoxicilina/ácido clavulánico en la proporción 4/1 durante 30 minutos, antes de realizar el ensayo de la fagocitosis. Como partícula a fagocitar se utilizó S. aureus no productor de penicilinasa opsonizado con HPS al 5% en GHBSS. Los resultados se muestran en la tabla VI. Como se puede observar, la preincubación de los fagocitos con diferentes concentraciones de amoxicilina, ácido clavulánico o amoxicilina/ácido clavulánico (4/1) no modificó la capacidad fagocítica de estas células, en comparación con la del control (PMN no expuestos a antimicrobiano).

2. Efecto directo de los antimicrobianos sobre los mecanismos bactericidas dependientes del oxígeno de los PMN.

2.1. Producción de radicales superóxido ( $O_2^-$ ).

La producción de  $O_2^-$  por los PMN fue medida tras exponerlos a diferentes concentraciones de amoxicilina, ácido clavulánico y la combinación amoxicilina/ácido clavulánico (4/1). Los resultados correspondientes a esta serie de experimentos se muestran en la tabla VII.

La preincubación de los PMN con 10 y 100 mg/l de amoxicilina no influyó en la producción de radicales superóxido por los mismos. Cuando los PMN eran preincubados con elevadas concentraciones (100 mg/l) de ácido clavulánico, sin embargo, se observaba una reducción significativa en la producción de



$O_2^-$  por los mismos. A esta concentración, la cantidad de radicales superóxido a los 60 minutos fue de  $88 \pm 30$  nmoles/mg de proteína para los controles sin tratamiento antimicrobiano y de  $34 \pm 6$  nmoles/mg de proteína para los PMN tratados con ácido clavulánico ( $p < 0,05$ ). La producción de radicales  $O_2^-$  también disminuyó, aunque en menor grado, en aquellos PMN que habían sido tratados con 100 mg/l de amoxicilina/ácido clavulánico (4/1).

## 2.2. Producción de peróxido de hidrógeno ( $H_2 O_2$ ).

La producción de  $H_2O_2$  por los PMN no se vio afectada cuando los fagocitos eran preincubados durante 30 minutos con 10 y 100 mg/l de amoxicilina, ácido clavulánico o la combinación amoxicilina/ácido clavulánico (4/1). Los resultados se muestran en la tabla VIII. La cantidad de peróxido de hidrógeno producida por los PMN expuestos a antimicrobiano osciló entre  $236 \pm 35$  para los PMN tratados con 100 mg/l de amoxicilina y  $277 \pm 68$  para los tratados con 10 mg/l de ácido clavulánico, siendo la del control de  $254 \pm 40$ .

Tabla VI: Efecto de la preincubación de los PMN con diferentes concentraciones (1, 10 y 100 mg/l) de amoxicilina, ácido clavulánico y la combinación amoxicilina / ácido clavulánico (4/1) en la fagocitosis de la cepa de S. aureus no productora de penicilinas (n= 3). Tiempo de fagocitosis: 12 minutos.

Antimicrobiano	Concentración (mg/l)	Porcentaje de fagocitosis <sup>a</sup>
Sin antimicrobiano		36 ± 9
Amoxicilina	1	45 ± 13
	10	41 ± 10
	100	36 ± 9
Acido clavulánico	1	46 ± 12
	10	40 ± 11
	100	34 ± 8
Amoxicilina/ ácido clavulánico (4/1)	1	36 ± 10
	10	34 ± 8
	100	31 ± 8

<sup>a</sup> bacterias opsonizadas con HPS al 5%

Tabla VII: Efecto de amoxicilina y ácido clavulánico, solos y combinados, en la producción de radicales superóxido por los PMN humanos (n= 4). Los PMN fueron incubados con los antimicrobianos durante 30 minutos a 37°C.

Antimicrobiano	Concentración (mg/l)	Producción de superóxido <sup>a</sup> (Nmol/mg proteína)
Sin antimicrobiano		88 ± 30
Amoxicilina	1	ND
	10	82 ± 20
	100	58 ± 12
Acido clavulánico	1	ND
	10	80 ± 10
	100	34 ± 6 <sup>b</sup>
Amoxicilina/ Acido clavulánico (4/1)	1	ND
	10	101 ± 33
	100	46 ± 6 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Estímulo PMA (200 nM).

<sup>b</sup> p < 0,05.

ND: no determinado.

Tabla VIII: Efecto de amoxicilina y ácido clavulánico, solos y en combinación, en la producción de peróxido de hidrógeno por los PMN humanos (n= 4). Los PMN fueron incubados con los antimicrobianos durante 30 minutos a 37°C.

Antimicrobiano	Concentración (mg/l)	Peróxido de hidrógeno <sup>a</sup> (Nmol/mg proteína)
Sin antimicrobiano		254 ± 40
Amoxicilina	1	254 ± 38
	10	268 ± 61
	100	236 ± 35
Acido Clavulánico	1	268 ± 57
	10	277 ± 68
	100	271 ± 60
Amoxicilina/ Acido clavulánico (4/1)	1	270 ± 55
	10	276 ± 65
	100	271 ± 58

<sup>a</sup> Estímulo: PMA (200 nM).

**Actividad intracelular de los antimicrobianos.**

La actividad intracelular de diferentes concentraciones de amoxicilina y ácido clavulánico, solos o combinados, fue evaluada en un ensayo de 3 horas (tabla IX). Aunque ni amoxicilina ni ácido clavulánico modificaron la supervivencia en el interior de los PMN de S. aureus productor de penicilinas, la combinación amoxicilina/ácido clavulánico (4/1), a la concentración más alta ensayada (100mg/l), incrementó significativamente la muerte intracelular de este microorganismo. A esta concentración, los porcentajes de supervivencia de S. aureus fueron de  $84,3 \pm 12,5$  en los controles sin antimicrobiano y  $52,6 \pm 4,7$  en presencia de amoxicilina/ácido clavulánico (4/1) ( $p < 0,05$ ).

Tabla IX: Efecto de amoxicilina y ácido clavulánico, solos y combinados, en la supervivencia en el interior de los PMN humanos de la cepa de S. aureus productora de penicilinas (n=4).

Antimicrobiano	Concentración (mg/l)	% de supervivencia a las 3 h
Sin antimicrobiano		84,3 ± 12,5
Amoxicilina	1	70,5 ± 14,5
	10	73,6 ± 14
	100	72,0 ± 11,5
Acido clavulánico	1	74,3 ± 8,5
	10	68,2 ± 9,0
	100	68,1 ± 9,0
Amoxicilina/ Acido clavulánico (4/1)	1	73,3 ± 14
	10	68,0 ± 12
	100	52,6 ± 4,7 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> p < 0,05.

## INFLUENCIA DE AMPICILINA Y SULBACTAM, SOLOS O COMBINADOS SOBRE LAS FUNCIONES DE LOS PMN HUMANOS.

Efecto de la preincubación bacteriana con concentraciones subinhibitorias de los antimicrobianos en la opsonización y fagocitosis de S. aureus por los PMN.

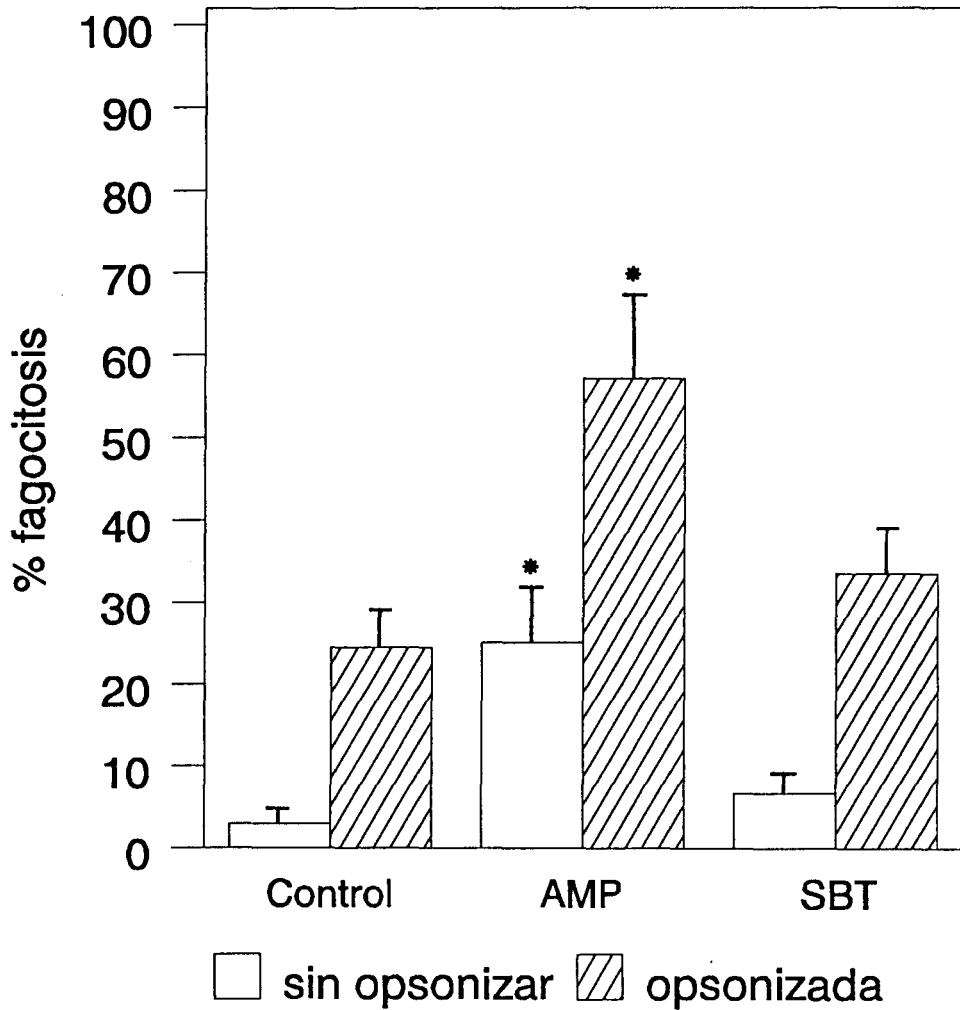
En la figura 13 se muestran los porcentajes de fagocitosis de la cepa de S. aureus no productora de penicilinasas tras exponerla durante 18 horas a 0.25 CMI de ampicilina y sulbactam. Como se puede observar, la exposición de esta cepa a 0,25 CMI de ampicilina determinó un incremento significativo en su fagocitosis por los PMN, tanto de bacterias no opsonizadas (% de fagocitosis:  $25,1 \pm 7,4$  para las bacterias expuestas a ampicilina y  $3 \pm 2$  para los controles sin tratamiento antimicrobiano previo), como de las opsonizadas (% de fagocitosis:  $57,1 \pm 11$  para las bacterias pretratadas con 0,25 CMI de ampicilina y  $24,5 \pm 5,3$  para los controles). El tratamiento previo con 0,25 CMI de sulbactam, sin embargo, no produjo ningún efecto. Con respecto a la cepa de S. aureus productora de betalactamasa, la exposición durante 18 horas a 0,25 CMI de ampicilina o sulbactam no determinó en ningún caso diferencias significativas en los porcentajes de fagocitosis en comparación con los de las bacterias no sometidas a tratamiento antibiótico (figura 14).

Para evaluar el efecto de los dos antimicrobianos conjuntamente, se preincubaron las 2 cepas de S. aureus con 0,25 CMI de diferentes combinaciones de ampicilina/sulbactam durante 18 horas, antes de realizar el ensayo de la fagocitosis. Las combinaciones de betalactámico/inhibidor de betalactamasas empleadas fueron de 2/1, 1/1, 1/4, 1/8 y 1/32. Al utilizar la cepa de S. aureus no productora de betalactamasa (figura 15), la exposición de las bacterias a 0,25 CMI de las diferentes combinaciones de ampicilina/sulbactam determinó un incremento significativo en la ingestión por los PMN humanos. Este incremento fue generalmente superior con las combinaciones

que contenían mayor concentración de ampicilina (2/1, 1/1 y 1/4). Con la cepa productora de penicilinas, sin embargo, los porcentajes de fagocitosis de las bacterias sometidas a tratamiento antibiótico, con independencia de la combinación utilizada, fueron muy similares a los de los controles no tratados (figura 16).

En otra serie de experimentos, las 2 cepas de S. aureus fueron expuestas a 0,25 CMI de ampicilina, sulbactam, o la combinación ampicilina/sulbactam (2/1) durante 4 horas, en lugar de las 18 horas empleadas anteriormente. Tras este periodo de exposición, los porcentajes de fagocitosis de las bacterias que habían sido expuestas a 0,25 CMI de ampicilina, sulbactam y la combinación ampicilina/sulbactam (2/1) fueron muy similares a los de los controles (bacterias no expuestas a antimicrobiano), independientemente de la cepa de S. aureus que se utilizara. Los resultados quedan reflejados en las figuras 17 y 18.



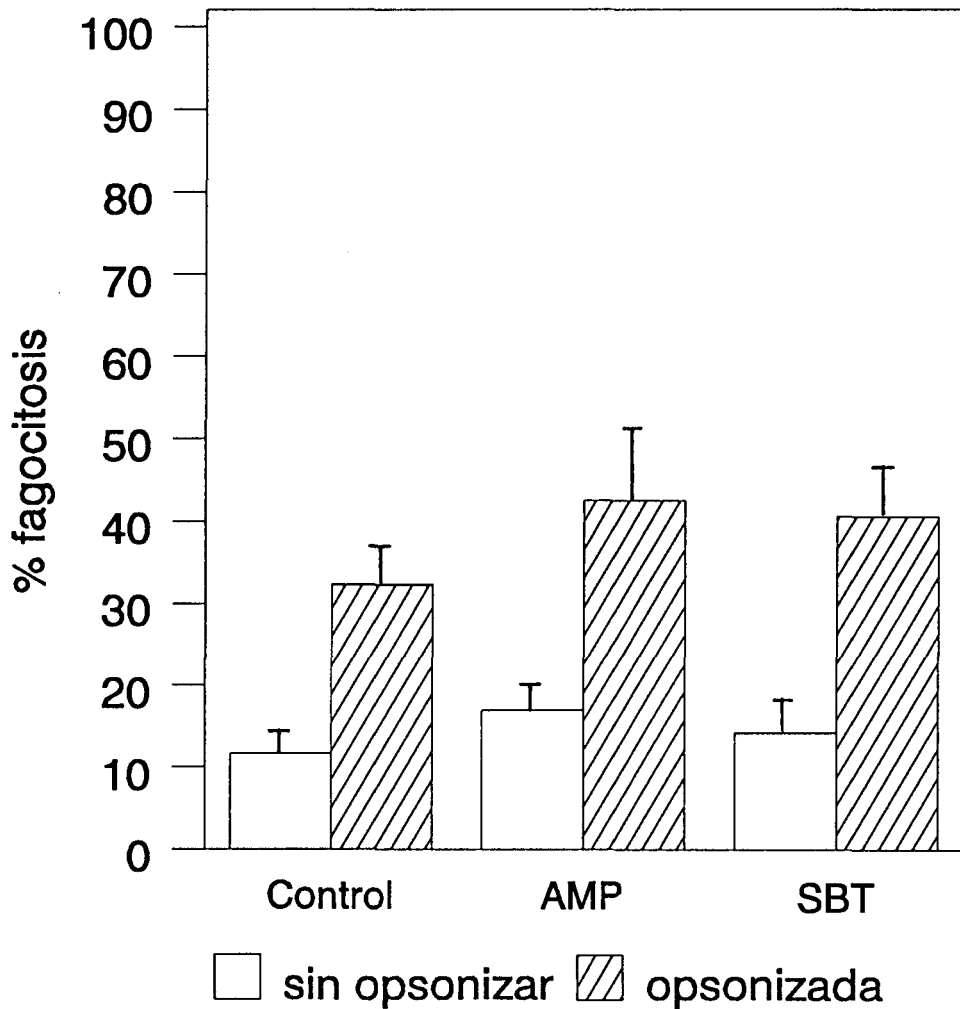
**Figura 13:**

Efecto de la exposición de la cepa de *S. aureus* no productora de penicilinas durante 18 horas a 0,25 CMI de ampicilina (AMP) y sulbactam (SBT) en su fagocitosis por PMN humanos (n=5).

Tiempo de fagocitosis: 12 minutos.

Control: bacterias no expuestas.

\*  $p < 0,05$

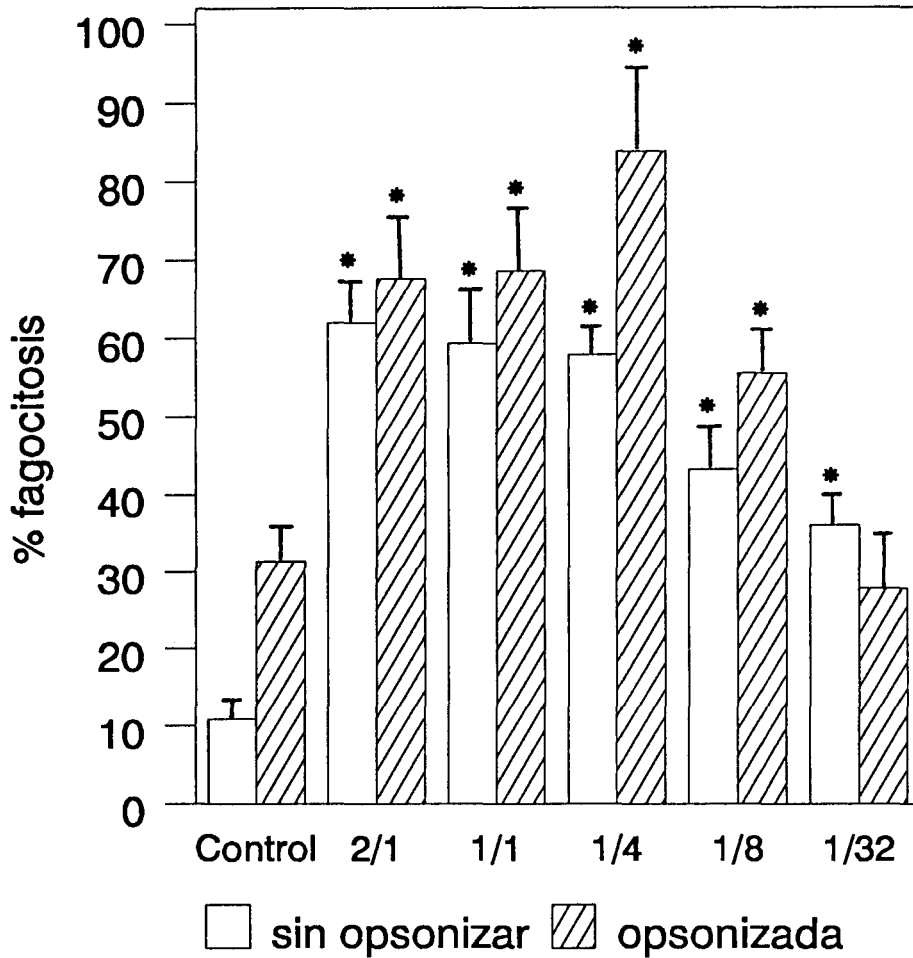
**Figura 14:**

Efecto de la exposición de la cepa de *S. aureus* productora de penicilinas durante 18 horas a 0,25 CMI de ampicilina (AMP) y sulbactam (SBT) en su fagocitosis por PMN humanos (n=5).

Tiempo de fagocitosis: 12 minutos.

Control: bacterias no expuestas.

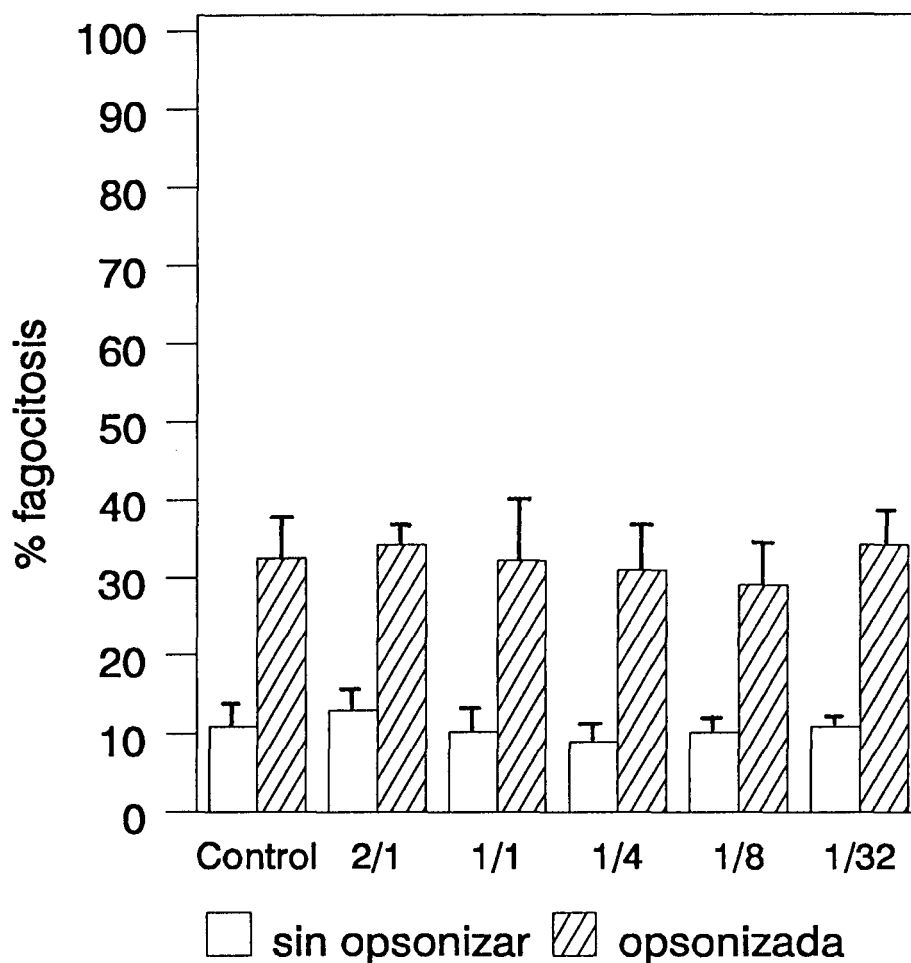
\*  $p < 0,05$



### Figura 15:

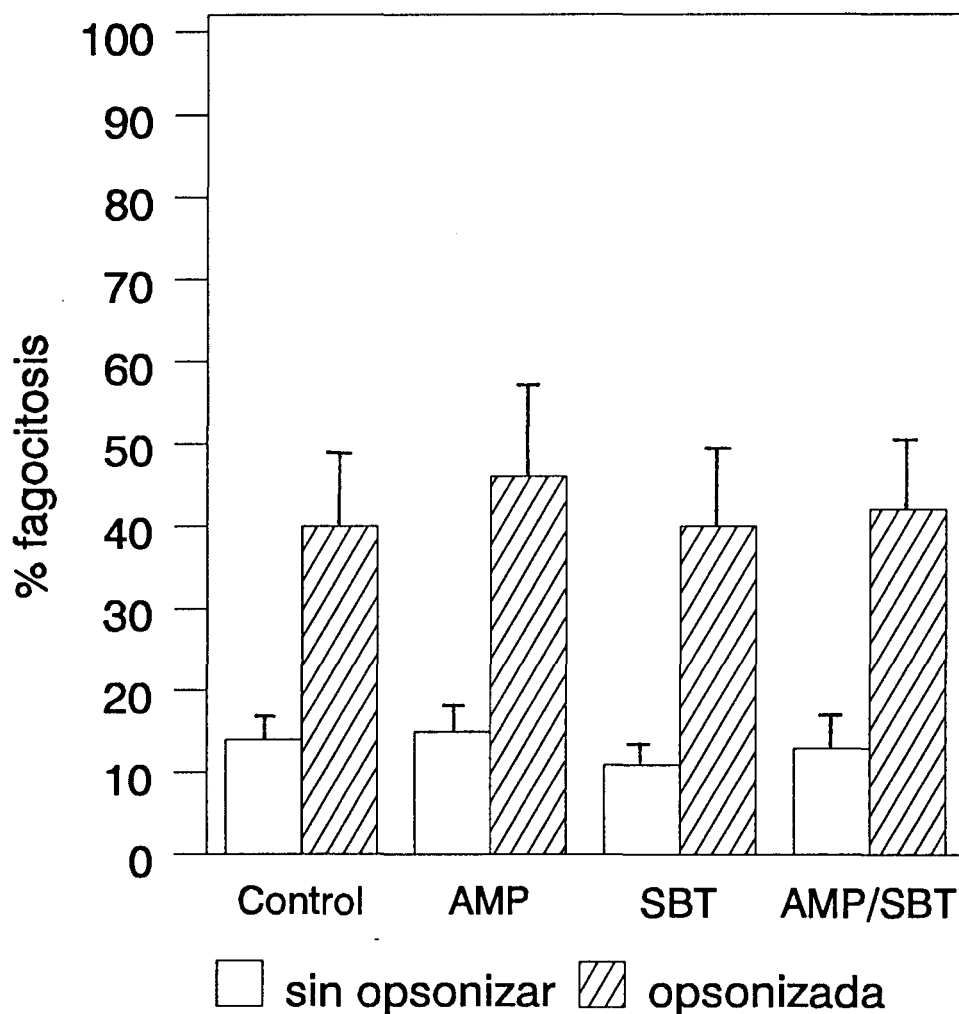
Efecto de la exposición de la cepa de *S. aureus* no productora de penicilinas durante 18 horas a 0,25 CMI de diferentes combinaciones de ampicilina/sulbactam (2/1, 1/1, 1/4, 1/8 y 1/32) en su fagocitosis por PMN humanos (n=4). Tiempo de fagocitosis: 12 minutos. Control: bacterias no expuestas.

\*  $p < 0,05$

**Figura 16:**

Efecto de la exposición de la cepa de *S. aureus* productora de penicilinas durante 18 horas a 0,25 CMI de diferentes combinaciones de ampicilina/sulbactam (2/1, 1/1, 1/4, 1/8 y 1/32) en su fagocitosis por PMN humanos (n=4). Tiempo de fagocitosis: 12 minutos. Control: bacterias no expuestas.

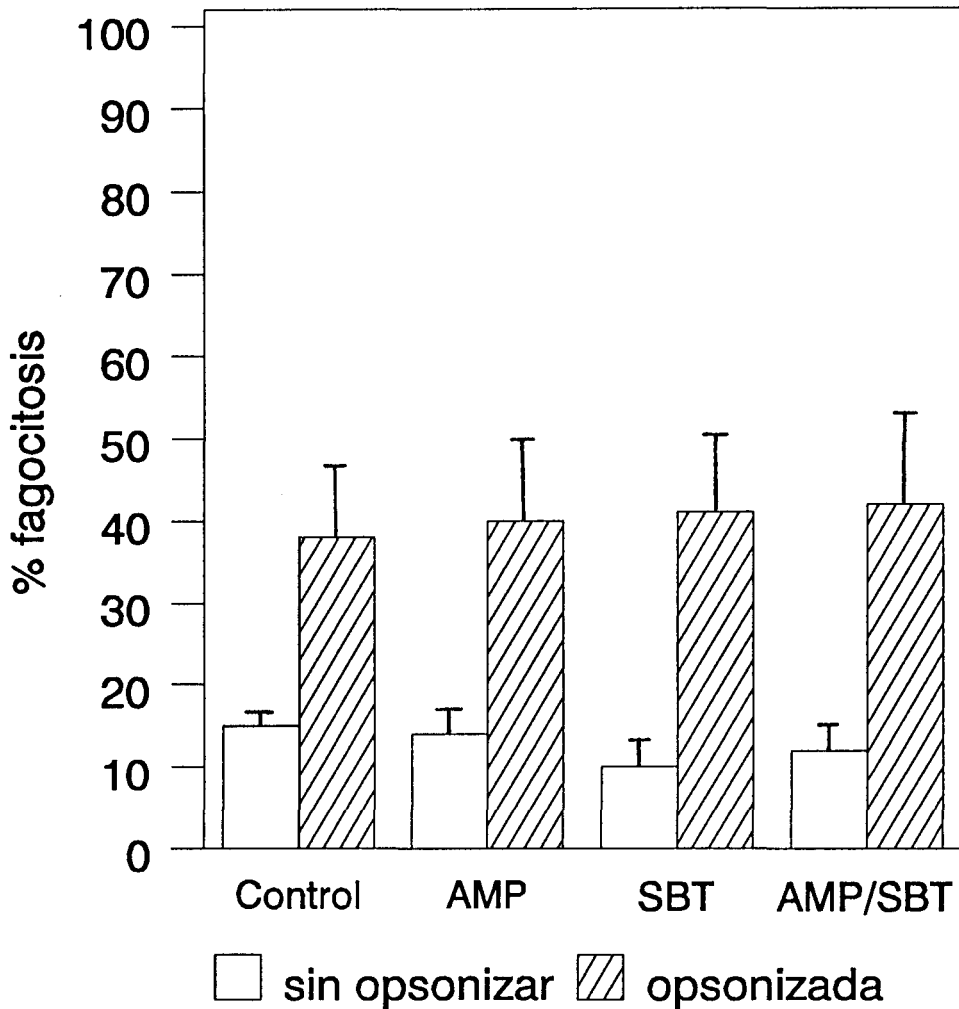
\*  $p < 0,05$



**Figura 17:**

Efecto de la exposición de la cepa de *S. aureus* no productora de penicilinas durante 4 horas a 0,25 CMI de ampicilina (AMP), sulbactam (SBT) y la combinación ampicilina/sulbactam (2/1) (AMP/SBT) en su fagocitosis por PMN humanos (n=3). Tiempo de fagocitosis: 12 minutos. Control: bacterias no expuestas.

\*  $p < 0,05$



**Figura 18:**

Efecto de la exposición de la cepa de *S. aureus* productora de penicilinas durante 4 horas a 0,25 CMI de ampicilina (AMP), sulbactam (SBT) y la combinación ampicilina/sulbactam (2/1) (AMP/SBT) en su fagocitosis por PMN humanos (n=3). Tiempo de fagocitosis: 12 minutos. Control: bacterias no expuestas.

\*  $p < 0,05$

Influencia directa de los antimicrobianos sobre la capacidad fagocítica y los mecanismos bactericidas dependientes del oxígeno de los PMN.

1. Efecto directo de los antimicrobianos sobre la capacidad fagocítica de los PMN.

Tras incubar los PMN humanos durante 30 minutos con 1, 10 y 100 mg/l de ampicilina, sulbactam y la combinación ampicilina/sulbactam (2/1), se midió la capacidad fagocítica de los mismos y se comparó con la de PMN no expuestos a antimicrobiano. La partícula a fagocitar utilizada en esta serie de experimentos fue, al igual que con la pareja de amoxicilina y ácido clavulánico, la cepa de S. aureus no productora de penicilinas opsonizada con HPS al 5% en GHBSS. Ninguno de los antimicrobianos, a las concentraciones ensayadas, modificó la capacidad fagocítica de los PMN. Los resultados se muestran en la tabla X. El porcentaje de fagocitosis para los PMN no expuestos a antimicrobiano fue de  $38 \pm 7$  ( $X \pm SEM$ ), mientras que el de los PMN expuestos osciló entre  $34 \pm 8$  ( $X \pm SEM$ ) de los PMN en presencia de 10 mg/l de ampicilina y  $42 \pm 12$  ( $X \pm SEM$ ) de los PMN expuestos a 100 mg/l de la asociación ampicilina/sulbactam (2/1).

2. Efecto de los antimicrobianos sobre los mecanismos bactericidas dependientes del oxígeno de los PMN.

2.1. Producción de radicales superóxido ( $O_2^-$ ).

Después de exponer a los PMN durante 30 minutos a diferentes concentraciones (1, 10 y 100 mg/l) de ampicilina, sulbactam y la combinación ampicilina/sulbactam (2/1), se midió la producción de  $O_2^-$  por estas células mediante la técnica de reducción del ferricitocromo C (Tabla XI). En presencia de ampicilina/sulbactam (2/1), a la mayor concentración ensayada (100 mg/l), disminuyó la producción de  $O_2^-$  medida a los 60 minutos de añadir el estímulo (PMA: 200 nM), sin embargo, la

diferencia con el control (PMN no expuestos a antimicrobiano) no fue estadísticamente significativa. Con las otras concentraciones de la asociación ampicilina/sulbactam ensayadas, así como con ampicilina y sulbactam por separado, tampoco se observó ninguna modificación en la producción de  $O_2^-$  por los PMN.

## 2.2. Producción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

La producción de  $H_2O_2$ , al igual que sucedió con la de  $O_2^-$ , no se vio modificada al exponer a los PMN durante 30 minutos a diferentes concentraciones (las mismas que se utilizaron en el el ensayo del superóxido) de ampicilina, sulbactam y la combinación ampicilina/sulbactam (2/1). Los resultados quedan reflejados en la tabla XII.



Tabla XI: Efecto de ampicilina y sulbactam, solos y combinados, en la producción de radicales superóxido por los PMN humanos (n= 6). Los PMN fueron incubados con los antimicrobianos durante 30 min. a 37°C.

Antimicrobiano	Concentración (mg/l)	Producción de superóxido <sup>a</sup> (Nmol/mg proteína)
Sin antimicrobiano		186 ± 37
Ampicilina	1	168 ± 31
	10	158 ± 33
	100	183 ± 30
Sulbactam	1	155 ± 26
	10	154 ± 41
	100	170 ± 29
Ampicilina/ Sulbactam (2/1)	1	174 ± 40
	10	174 ± 37
	100	128 ± 36

<sup>a</sup> Estímulo: PMA (200 nM).

Tabla XII: Efecto de ampicilina y sulbactam, solos o en combinación, en la producción de peróxido de hidrógeno por los PMN humanos (n= 6). Los PMN fueron incubados con los antimicrobianos durante 30 minutos a 37°C.

Antimicrobiano	Concentración (mg/l)	Peróxido de hidrógeno <sup>a</sup> (Nmol/mg proteína)
Sin antimicrobiano		269 ± 39
Ampicilina	1	245 ± 48
	10	251 ± 66
	100	269 ± 48
Sulbactam	1	282 ± 69
	10	251 ± 75
	100	275 ± 48
Ampicilina	1	264 ± 34
Sulbactam (2/1)	10	275 ± 37
	100	273 ± 45

<sup>a</sup> Estímulo: PMA (200 nM).

**Actividad intracelular de los antimicrobianos.**

La actividad intracelular de diferentes concentraciones (1, 10 y 100 mg/l) de ampicilina, sulbactam y la asociación ampicilina/sulbactam (2/1) fue evaluada en un ensayo de 3 horas, utilizando la cepa de S. aureus productora de penicilinasa. Ninguno de los antimicrobianos por separado, o asociados, a las concentraciones ensayadas, modificó la supervivencia en el interior de los PMN de S. aureus. Los resultados correspondientes a esta serie de experimentos se muestran en la tabla XIII.

Tabla XIII: Efecto de ampicilina y sulbactam, solos y en combinación, en la supervivencia en el interior de los PMN humanos de la cepa de S. aureus productora de penicilinasas (n=4).

Antimicrobiano	Concentración	% de supervivencia (mg/l) a las 3 h
Sin antimicrobiano	1	29 ± 6
Ampicilina	1	29 ± 11
	10	26 ± 11
	100	34 ± 12
Sulbactam	1	39 ± 11
	10	35 ± 9
	100	33 ± 8
Ampicilina/ Sulbactam (2/1)	1	34 ± 5
	10	27 ± 4
	100	22 ± 4

## INFLUENCIA DE PIPERACILINA Y TAZOBACTAM, SOLOS O COMBINADOS, SOBRE LAS FUNCIONES DE LOS PMN

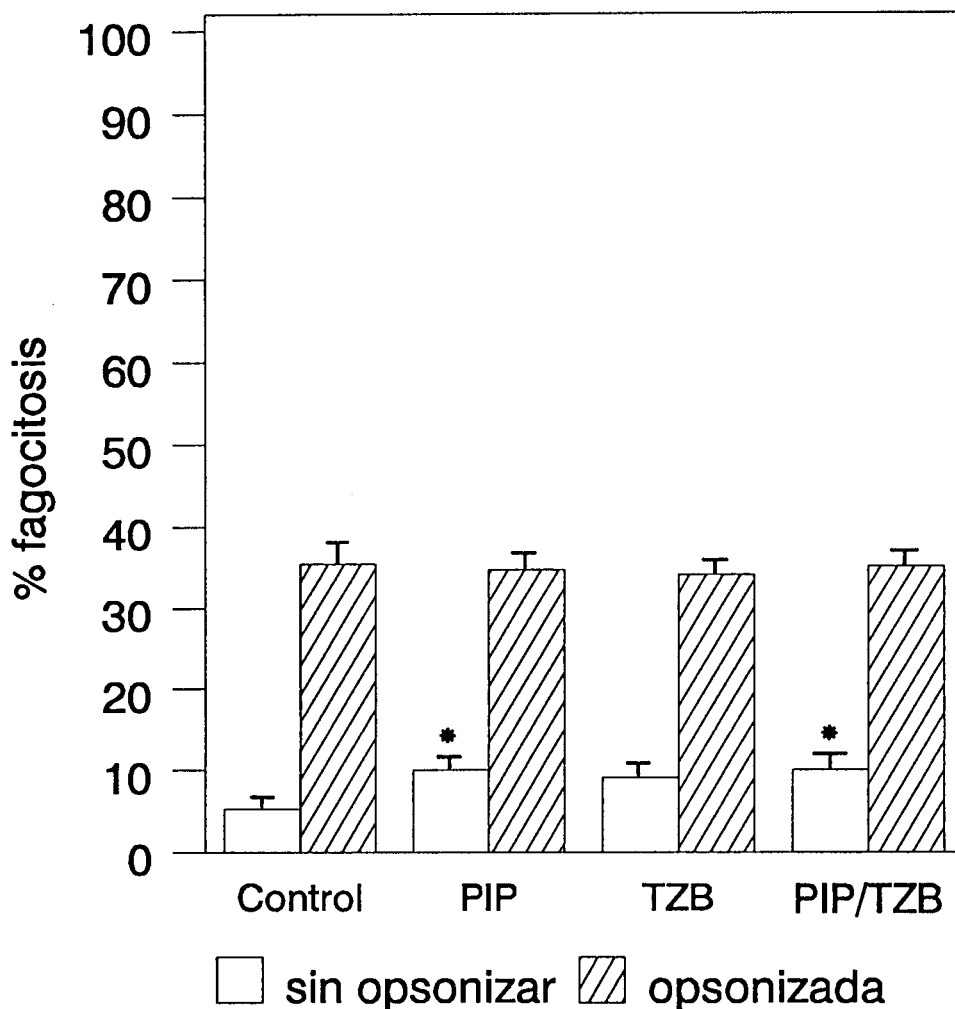
Efecto de la preincubación bacteriana con concentraciones subinhibitorias de los antimicrobianos en la opsonización y fagocitosis de S. aureus por los PMN.

La exposición de la cepa de S. aureus no productora de penicilinas a 0,25 CMI de piperacilina durante 18 horas, determinó un marcado incremento en su fagocitosis por los PMN (figura 19). Este efecto se manifestó en bacterias no opsonizadas, para las que el porcentaje de fagocitosis fue de  $10 \pm 9$ , en comparación con  $5,3 \pm 0,7$ , obtenido con bacterias no expuestas a antimicrobiano (control) ( $p < 0,05$ ). Con bacterias opsonizadas, sin embargo, no se observaron diferencias entre la ingestión por parte de los PMN humanos de las bacterias expuestas a concentraciones subinhibitorias de piperacilina, (% de fagocitosis:  $34,8 \pm 2,5$  ( $X \pm SEM$ )) y el control (% de fagocitosis:  $35,4 \pm 3,2$ ). El mismo efecto se observó tras la exposición durante 18 horas de esta cepa a 0,25 CMI de la combinación piperacilina/tazobactam (8/1), la ingestión de bacterias no opsonizadas fue significativamente superior en el caso de bacterias expuestas a esta asociación (% de fagocitosis:  $10 \pm 2,1$  ( $X \pm SEM$ )) ( $p < 0,05$ ), mientras que con bacterias opsonizadas no se observaron diferencias. Con respecto a la preincubación con 0,25 CMI de tazobactam solo, aunque el porcentaje de fagocitosis de bacterias no opsonizadas fue más alto que el del control ( $9,1 \pm 2,4$  ( $X \pm SEM$ )), este incremento no fue estadísticamente significativo.

En el caso de la cepa S. aureus productora de penicilinas, la preincubación de la misma con 0,25 CMI de piperacilina, tazobactam o la combinación piperacilina/tazobactam (8/1) durante 18 horas no modificó su fagocitosis por los PMN. Los resultados quedan recogidos en la figura 20.

El incremento en la fagocitosis de bacterias no

opsonizadas observado con la cepa de S. aureus no productora de penicilinas, tras exponerla a 0,25 CMI de piperacilina o de la combinación piperacilina/tazobactam (8/1) durante 18 horas, también se observó cuando el período de exposición a los antimicrobianos se redujo a 4 horas (figura 21). Tazobactam no determinó ningún efecto y, en el caso de la cepa productora de penicilinas (figura 22), se volvió a reproducir la falta de influencia observada anteriormente.

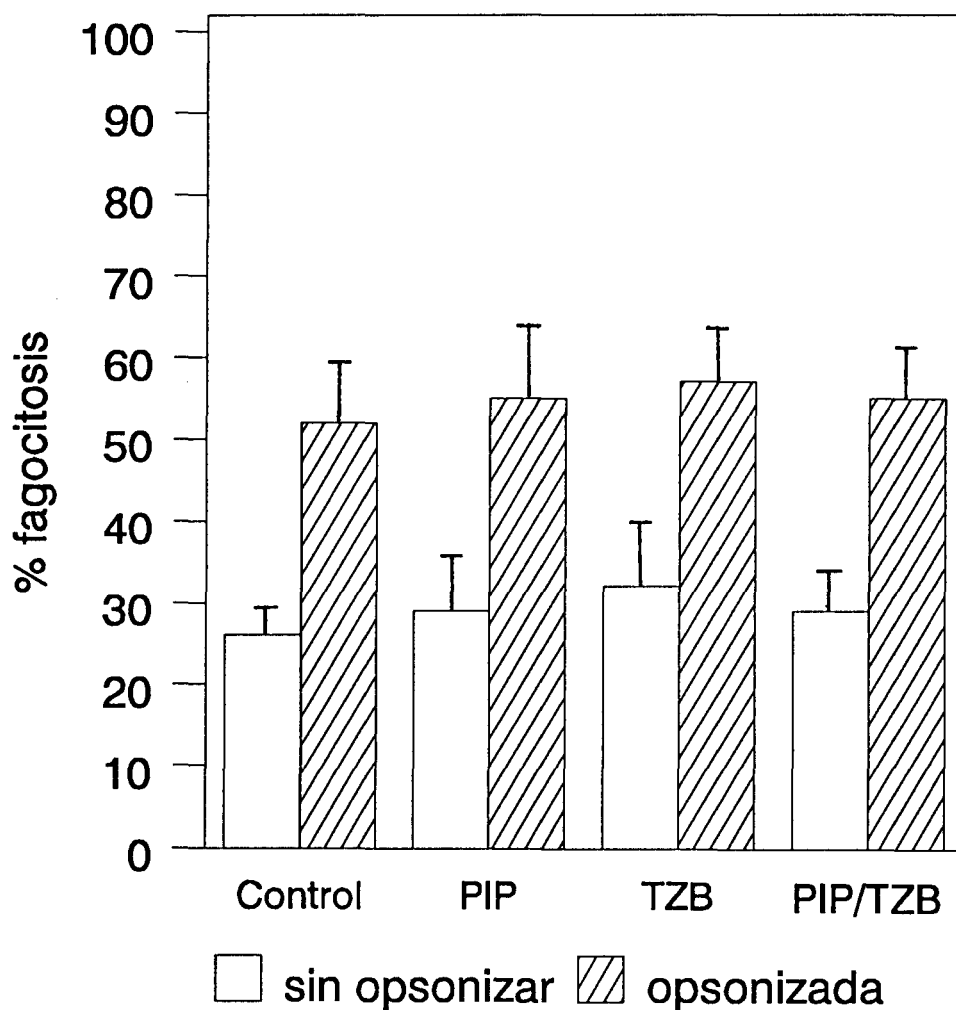


### Figura 19:

Efecto de la exposición de la cepa de *S. aureus* no productora de penicilinas durante 18 horas a 0,25 CMI de piperacilina (PIP), tazobactam (TZB) y la combinación piperacilina/tazobactam (8/1) (PIP/TZB) en su fagocitosis por PMN humanos (n=4). Tiempo de fagocitosis: 12 minutos. Control: bacterias no expuestas.

\*  $p < 0,05$



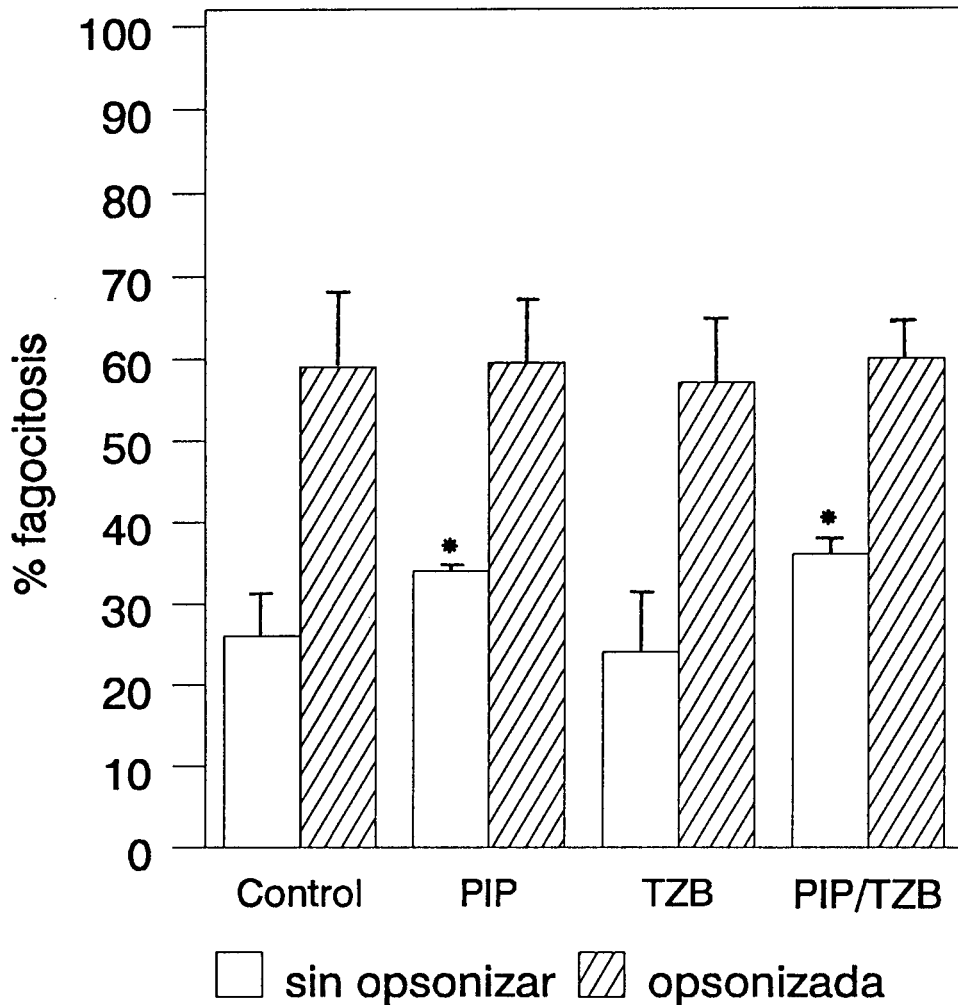
**Figura 20:**

Efecto de la exposición de la cepa de *S. aureus* productora de penicilinas durante 4 horas a 0,25 CMI de piperacilina (PIP), tazobactam y la combinación piperacilina/tazobactam (8/1) (PIP/TZB) en su fagocitosis por PMN humanos (n=3). Tiempo de fagocitosis: 12 minutos.

Control: bacterias no expuestas.

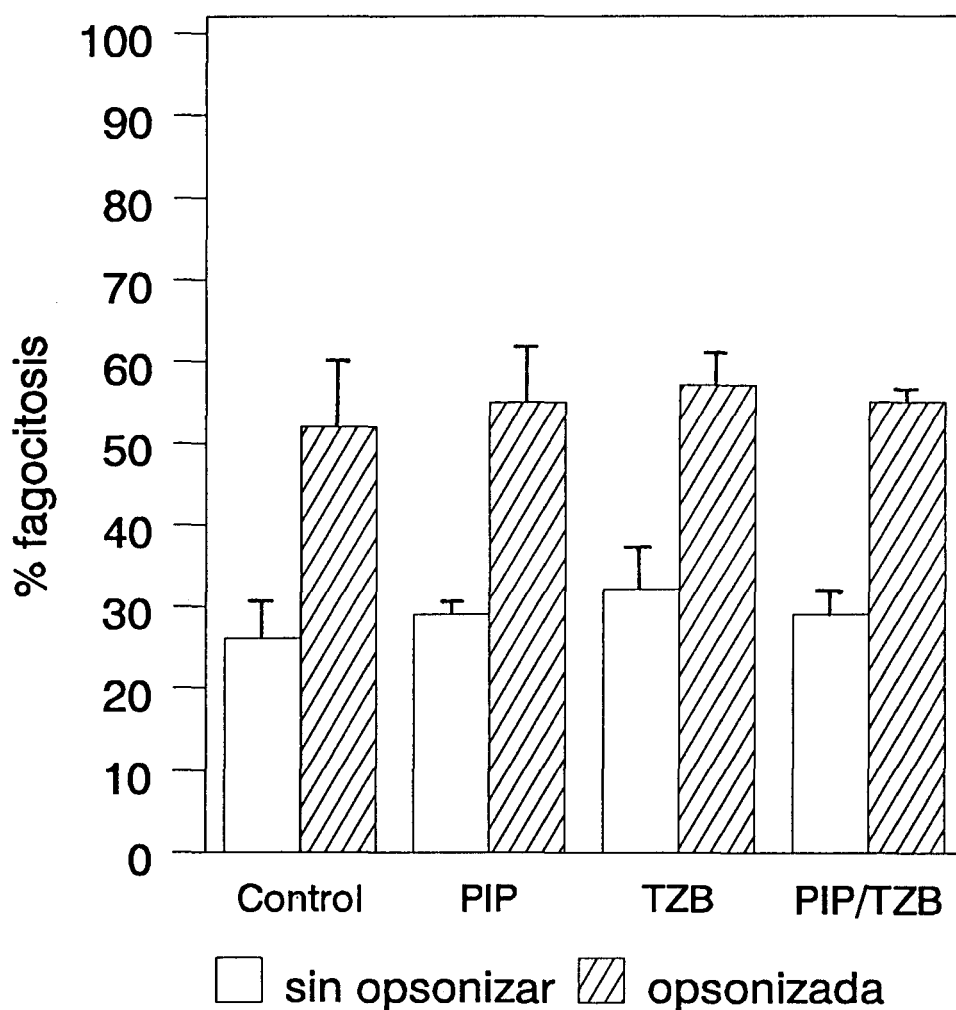
\*  $p < 0,05$



**Figura 21:**

Efecto de la exposición de la cepa de *S. aureus* no productora de penicilinas durante 4 horas a 0,25 CMI de piperacilina (PIP), tazobactam (TZB) y la combinación piperacilina/tazobactam (8/1) (PIP/TZB) en su fagocitosis por PMN humanos (n=3). Tiempo de fagocitosis: 12 minutos. Control: bacterias no expuestas.

\*  $p < 0,05$

**Figura 22:**

Efecto de la exposición de la cepa de *S. aureus* productora de penicilinas durante 4 horas a 0,25 CMI de piperacilina (PIP), tazobactam y la combinación piperacilina/tazobactam (8/1) (PIP/TZB) en su fagocitosis por PMN humanos (n=3). Tiempo de fagocitosis: 12 minutos.

Control: bacterias no expuestas.

\*  $p < 0,05$

## Influencia directa de los antimicrobianos sobre la capacidad fagocítica y los mecanismos bactericidas dependientes del oxígeno de los PMN

1. Efecto directo de los antimicrobianos sobre la capacidad fagocítica de los PMN.

Se evaluó la influencia directa de piperacilina, tazobactam y la asociación piperacilina/tazobactam (8/1) sobre la capacidad fagocítica de los PMN, exponiendo dichas células durante 30 minutos a diferentes concentraciones de los antimicrobianos (1, 10 y 100 mg/l) antes de realizar el ensayo de la fagocitosis. La partícula a fagocitar utilizada en esta serie de experimentos fue, al igual que con las parejas amoxicilina-ácido clavulánico y ampicilina-sulbactam, S. aureus no productor de penicilinas opsonizado con HPS al 5% en GHBSS. Los porcentajes de fagocitosis (tabla XIV) oscilaron entre  $32 \pm 8$  ( $X \pm SEM$ ) para los PMN expuestos a 100 mg/l de piperacilina/tazobactam (8/1) y  $41 \pm 6$  para los PMN expuestos a 100 mg de tazobactam. El porcentaje de fagocitosis del control (PMN no expuestos a antimicrobiano) fue de  $38 \pm 9$ . La capacidad de ingestión de los PMN no se vio modificada por estos antimicrobianos.

2. Efecto directo de los antimicrobianos sobre los mecanismos bactericidas dependientes del oxígeno de los PMN.

### 2.1. Producción de radicales superóxido ( $O_2^-$ ).

Tras incubar los PMN durante 30 minutos con 1, 10 y 100 mg/l de piperacilina, tazobactam y piperacilina/tazobactam (8/1). Se midió la producción de radicales superóxido por los mismos mediante la técnica basada en la reducción del ferricitocromo C. Los resultados se encuentran en la tabla XV. Piperacilina, a la mayor concentración ensayada (100 mg/l) y la asociación piperacilina/tazobactam (8/1), a concentraciones de 10 y 100 mg/l, determinaron una reducción en la producción

de  $O_2^-$  por los leucocitos PMN. La cantidad de  $O_2^-$  producida por los PMN no expuestos a antimicrobiano, a los 60 minutos de añadir el estímulo (PMA 200 nM), fue de  $137 \pm 38$  Nmoles/mg de proteína, mientras que en el caso de los PMN preincubados con 100 mg/l de piperacilina fue de  $82 \pm 38$  y con 10 y 100 mg/l de piperacilina/tazobactam (8/1) de  $86 \pm 30$  y  $87 \pm 27$ , respectivamente ( $p < 0,05$ ). La preincubación con tazobactam, sin embargo, no afectó la producción de  $O_2^-$  por los PMN.

## 2.2. Producción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )

La producción de peróxido de hidrógeno por los PMN no se vio afectada cuando las células habían sido preincubadas durante 30 minutos con diferentes concentraciones (las mismas empleadas en el ensayo del  $O_2^-$ ) de piperacilina, tazobactam o la asociación piperacilina/tazobactam (8/1) (tabla XVI). La cantidad de peróxido de hidrógeno producida a los 60 minutos de añadir el estímulo (PMA: 200 nM) osciló entre  $245 \pm 42$  Nmoles/mg de proteína para los PMN expuestos a 10 mg/l de tazobactam y  $293 \pm 58$  Nmoles/mg de proteína para los PMN preincubados con 1 mg/l de la combinación piperacilina/tazobactam (8/1). La cantidad de  $H_2O_2$  producida por el control (PMN no expuestos a antimicrobiano) fue de  $258 \pm 46$  Nmoles/mg de proteína.

Tabla XIV: Efecto de la preincubación de los PMN humanos con diferentes concentraciones (1, 10 y 100 mg/l) de piperacilina, tazobactam y la combinación piperacilina/tazobactam (8/1) en la fagocitosis de la cepa de S. aureus no productora de penicilinas (n= 3). Tiempo de fagocitosis: 12 minutos.

Antimicrobiano	Concentración (mg/l)	Porcentaje de fagocitosis <sup>a</sup>
Sin antimicrobiano		38 ± 9
Piperacilina	1	35 ± 10
	10	38 ± 8
	100	37 ± 10
Tazobactam	1	36 ± 10
	10	40 ± 7
	100	41 ± 6
Piperacilina/ Tazobactam (8/1)	1	40 ± 12
	10	38 ± 10
	100	32 ± 8

<sup>a</sup> bacterias opsonizadas con HPS al 5%

Tabla XV: Efecto de piperacilina y tazobactam, solos y combinados, en la producción de radicales superóxido por los PMN humanos (n= 5). Los PMN fueron incubados con los antimicrobianos durante 30 min. a 37°C.

Antimicrobiano	Concentración (mg/l)	Producción de superóxido <sup>a</sup> (Nmol/mg proteína)
Sin antimicrobiano		137 ± 38
Piperacilina	1	101 ± 41
	10	101 ± 36
	100	82 ± 38 <sup>b</sup>
Tazobactam	1	109 ± 42
	10	108 ± 42
	100	113 ± 43
Piperacilina	1	109 ± 35
Tazobactam (8/1)	10	86 ± 30 <sup>b</sup>
	100	87 ± 27 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Estímulo: PMA (200 nM).

<sup>b</sup> p < 0,05.

Tabla XVI: Efecto de piperacilina y tazobactam, solos o en combinación, en la producción de peróxido de hidrógeno por los PMN humanos (n= 5). Los PMN fueron incubados con los antimicrobianos durante 30 minutos a 37°C.

Antimicrobiano	Concentración (mg/l)	Peróxido de hidrógeno <sup>a</sup> (Nmol/mg proteína)
Sin antimicrobiano		258 ± 46
Piperacilina	1	279 ± 43
	10	266 ± 31
	100	290 ± 65
Tazobactam	1	266 ± 40
	10	245 ± 42
	100	286 ± 47
Piperacilina/ Tazobactam (8/1)	1	293 ± 58
	10	285 ± 50
	100	292 ± 67

<sup>a</sup> Estímulo PMA (200 nM).

### Actividad intracelular de los antimicrobianos

La actividad intracelular de piperacilina y tazobactam, solos o combinados, fue evaluada en un ensayo de 3 horas, comparando la supervivencia en el interior de los PMN de la cepa de S. aureus productora de penicilinas en un medio sin antimicrobiano (control) con la obtenida en un medio con distintas concentraciones (1, 10 y 100 mg/l) de piperacilina, tazobactam o la asociación piperacilina/tazobactam (8/1). En la tabla XVII se muestran los resultados correspondientes a esta serie de experimentos. Como se puede observar, ninguno de los antimicrobianos, solos o combinados, a las concentraciones ensayadas, modificó la supervivencia en el interior de los PMN humanos de la cepa de S. aureus productora de penicilinas.

Las tablas XVIII y XIX recogen en forma de resumen el efecto de los tres inhibidores de betalactamasas incluidos en este estudio, solos o asociados con aminopenicilinas, sobre la actividad de los leucocitos PMN humanos.



Tabla XVII: Efecto de piperacilina y tazobactam, solos y en combinación, en la supervivencia en el interior de los PMN humanos de la cepa de S. aureus productora de penicilinasa (n=4).

Antimicrobiano	Concentración	% de supervivencia (mg/l)a las 3 h
Sin antimicrobiano		26 ± 7
Piperacilina	1	28 ± 6
	10	24 ± 6
	100	23 ± 6
Tazobactam	1	27 ± 8
	10	25 ± 9
	100	29 ± 9
Piperacilina/ Tazobactam (8/1)	1	31 ± 10
	10	30 ± 11
	100	25 ± 8

Tabla XVIII: Tabla resumen del efecto de la preincubación bacteriana con subCMI de los inhibidores de betalactamasas solos o en combinación con aminopenicilinas en la actividad fagocítica de los PMN humanos. SANPP: S. aureus no productor de penicilinas; SAPP: S. aureus productor de penicilinas. CLAV: ácido clavulánico; AMX/CLAV: amoxicilina/ácido clavulánico; SBT: sulbactam, AMP/SBT: ampicilina/sulbactam, TZB: tazobactam; PIP/TZB: piperacilina/tazobactam.

	CLAV	AMX/CLAV	SBT	AMP/SBT	TZB	PIP/TZB
<b>SANPP</b>						
opsonizado	↑↑↑	↑↑↑	ϕ	↑↑↑	ϕ	ϕ
no opsonizado	↑↑↑	↑↑↑	ϕ	↑↑↑	ϕ	ϕ
<b>SAPP</b>						
opsonizado	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ
no opsonizado	↑	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ
ϕ: sin efecto						

Tabla XIX: Tabla resumen del efecto directo de los inhibidores de betalactamasas solos o en combinación con aminopenicilinas sobre las funciones de los PMN. CLAV: ácido clavulánico; AMX/CLAV: amoxicilina/ácido clavulánico; SBT: sulbactam; AMP/SBT: ampicilina/sulbactam; TZB: tazobactam; PIP/TZB: piperacilina/tazobactam.

FUNCION PMN	CLAV	AMX/CLAV	SBT	AMP/SBT	TZB	PIP/TZB
INGESTION	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ
PRODUCCION DE						
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	↓ <sup>a</sup>	↓ <sup>a</sup>	ϕ	ϕ	ϕ	↓ <sup>a,b</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ
ACTIVIDAD INTRA- CELULAR FRENTE	ϕ	↑ <sup>a</sup>	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ
A <u>S. AUREUS</u>						
	a: concentración del antimicrobiano: 100mg/l					
	b: concentración del antimicrobiano: 10 mg/l					

## **DISCUSSION**

Las bacterias son microorganismos con gran capacidad de adaptación, lo que les permite sobrevivir en condiciones ambientales muy adversas. Uno de los mecanismos de supervivencia más efectivos entre las bacterias patógenas es la producción de betalactamasas, enzimas que hidrolizan el anillo betalactámico de penicilinas y cefalosporinas, que de esta forma pierden su actividad antimicrobiana.

La prevalencia de microorganismos productores de betalactamasas va claramente en aumento, por lo que se ha hecho necesario buscar nuevas alternativas terapéuticas para hacer frente a este problema. Así, se han desarrollado nuevos antibacterianos, resistentes a las betalactamasas, como son las quinolonas, carbapenemas, monobactamas y cefamicinas. Por otra parte, se ha intentado restaurar la utilidad de antimicrobianos tan valiosos como las aminopenicilinas, mediante su asociación con moléculas que los protejan de la acción de las betalactamasas. De esta forma surgen los inhibidores de betalactamasas, entre los que destacan ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Esta nueva estrategia de asociar aminopenicilinas con inhibidores de betalactamasas ha supuesto un importante avance en el tratamiento de algunas infecciones, por lo que dichas asociaciones ocupan un lugar destacado en el actual arsenal terapéutico.

Los inhibidores de betalactamasas han sido y continúan siendo objeto de estudios exhaustivos, contemplándose aspectos tales como su mecanismo de acción, potencia antimicrobiana, espectro de actividad frente a las betalactamasas, características farmacocinéticas, efectos adversos, etc. Sin embargo, sólo se dispone de información escasa e incompleta sobre su influencia en el sistema inmune.

Hoy en día nadie pone en duda que el desenlace de un proceso infeccioso depende fundamentalmente del estado en que se encuentre el sistema inmune del sujeto que lo padece, siendo de especial importancia la actividad de sus células

fagocíticas, pues son las primeras en actuar contra los microorganismos una vez que estos han superado las barreras mecánicas externas.

El incremento en el número de pacientes con defectos del sistema fagocítico ha estimulado la búsqueda de antimicrobianos que si no potencien, al menos no alteren o disminuyan el funcionamiento de los mecanismos de defensa. Idealmente serían necesarias sustancias que, además de poseer propiedades antimicrobianas, actúen de forma sinérgica con los fagocitos, potenciando su actividad en la lucha contra los agentes infecciosos.

En este trabajo se estudian las interacciones entre los tres inhibidores de betalactamasas más desarrollados actualmente, ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, solos o asociados a amoxicilina, ampicilina y piperacilina, respectivamente y los leucocitos PMN humanos.

Los agentes antiinfecciosos pueden ejercer su influencia sobre los PMN de dos formas fundamentalmente: actuando directamente sobre las propias células fagocíticas, modulando las distintas etapas del proceso fagocítico como son la quimiotaxis, ingestión, degranulación y explosión oxidativa, o determinando modificaciones en los microorganismos, con consecuencias indirectas en las funciones de dichas células (93).

Los betalactámicos, a concentraciones subinhibitorias son capaces de facilitar el reconocimiento y destrucción de los microorganismos por parte del sistema fagocítico (23-34). La mayoría de los investigadores han evaluado la destrucción intracelular de microorganismos modificados por los antimicrobianos, siendo menos numerosos los estudios sobre la influencia de los mismos en la capacidad de ingestión de las células fagocíticas.

Existen varios métodos para medir la capacidad e ingestión por parte de los fagocitos, aunque probablemente el más reproducible es aquel que mide la radioactividad intracelular tras la ingesta de bacterias marcadas con radioisótopos (51). Utilizando este método, observamos que la preincubación de una cepa de S. aureus no productora de penicilinas con 0,25 CMI de amoxicilina, ampicilina y piperacilina, durante 18 horas, determinó un incremento significativo en su fagocitosis por parte de los leucocitos PMN. Este efecto fue observado tanto en bacterias opsonizadas como sin opsonizar, en el caso de amoxicilina y ampicilina, y sólo en bacterias sin opsonizar, en el caso de piperacilina. Parece pues que el incremento en la ingestión no estaría mediado por un efecto directo en la opsonización de las bacterias, sino que posiblemente sería debido a cambios morfológicos inducidos por los antimicrobianos en su superficie que facilitarían el reconocimiento e ingestión de las mismas por los neutrófilos, incluso en ausencia de opsoninas. Milatovic (94), empleando una metodología similar, no observó diferencias significativas en la ingestión de S. aureus por los fagocitos cuando las bacterias habían sido expuestas a 1/3 de la CMI de penicilina G o piperacilina, en comparación con la ingestión de bacterias no expuestas al antimicrobiano. En los experimentos realizados por esta investigadora, se utilizaron bacterias opsonizadas en suero puro, no sometiénolas después a un proceso de lavado para eliminar el exceso de opsoninas, antes de añadir las células fagocíticas, y no se realizaron estudios de ingestión de bacterias en ausencia de opsoninas. Estas condiciones experimentales podrían enmascarar el posible efecto favorecedor del reconocimiento bacteriano ejercido por los antimicrobianos.

Por lo que respecta a la cepa de S. aureus productora de penicilinas, la preincubación bacteriana con concentraciones subinhibitorias de estos antimicrobianos durante 18 horas, no determinó ningún efecto en la ingestión por los fagocitos, en comparación con la ingestión de bacterias no expuestas a

antimicrobiano. Probablemente los antimicrobianos serían inactivados por la penicilinasasa estafilocócica antes de poder determinar modificaciones en las bacterias que las hicieran más susceptibles de ser fagocitadas por los PMN.

Si analizamos el comportamiento de los tres inhibidores de betalactamasas estudiados, vemos que ácido clavulánico fue el único de ellos con efecto sobre la fagocitosis de S. aureus. La exposición de la cepa de S. aureus no productora de penicilinasasa a 0,25 CMI de este inhibidor de betalactamasas se tradujo en un marcado incremento en su ingestión por los PMN, tanto en el caso de bacterias opsonizadas como sin opsonizar, alcanzándose en este último caso porcentajes de fagocitosis catorce veces superiores a los del control. Este efecto favorecedor de la ingestión también fue observado con la cepa de S. aureus productora de penicilinasasa, pero únicamente en la fagocitosis de bacterias no opsonizadas. Por tanto, ácido clavulánico actuaría de forma similar a amoxicilina, ampicilina y piperacilina, produciendo modificaciones en estos microorganismos que se traducirían, en definitiva, en una más fácil ingestión de los mismos por los leucocitos PMN.

Los porcentajes de fagocitosis obtenidos con la cepa de S. aureus no productora de penicilinasasa tras exponerla durante 18 horas a 0,25 CMI de diferentes combinaciones de amoxicilina/ácido clavulánico fueron en todos los casos significativamente más altos que los del control (bacterias no expuestas a antimicrobiano). Hay que resaltar que los mayores incrementos se observaron con aquellas combinaciones en las que ácido clavulánico se encontraba en mayor proporción. Con la cepa de S. aureus productora de penicilinasasa, sin embargo, no se observó ningún efecto. Probablemente, la cantidad de ácido clavulánico en el caldo de cultivo era muy pequeña y podría ser fácilmente hidrolizado por la penicilinasasa antes de ser capaz de afectar a la bacteria. En este sentido, habrían sido necesarias concentraciones más altas de este inhibidor de betalactamasas para que quedase suficiente antimicrobiano libre



como para inducir el efecto mostrado en la cepa de S. aureus no productora de penicilinas. También podría influir la duración del período de incubación.

El incremento en la fagocitosis de la cepa de S. aureus no productora de penicilinas tras exponerla a 0,25 CMI de diferentes combinaciones de ampicilina/sulbactam, al contrario de lo que sucedía con la asociación amoxicilina/ácido clavulánico, parece más bien dependiente de la concentración de ampicilina que de la de sulbactam, como se demuestra por el hecho de que los mayores incrementos se observaron con aquellas asociaciones que contenían más ampicilina y que sulbactam "per se" no determinó ningún efecto. Esta afirmación podría hacerse extensible a la asociación piperacilina/tazobactam.

La reducción del período de exposición bacteriano a concentraciones subinhibitorias de los antimicrobianos de las dos cepas de S. aureus, determinó una serie de efectos en su ingestión por los neutrófilos, que pasaremos a analizar a continuación. Por una parte, observamos que ni amoxicilina ni ampicilina modificaron la ingestión de S. aureus no productor de penicilinas por los PMN, en contraposición al efecto favorecedor observado tras 18 horas de incubación. Piperacilina, sin embargo, volvió a mostrar el mismo efecto potenciador de la fagocitosis en bacterias no opsonizadas.

Por otra parte, ácido clavulánico, que fue el único de los inhibidores de betalactamasas con influencia sobre la ingestión de S. aureus por los PMN tras 18 horas de exposición, no mostró efecto sobre las bacterias expuestas durante 4 horas a 1/4 de la CMI del mismo. Sin embargo, asociado a amoxicilina, y con aquellas combinaciones que contenían mayor proporción de ácido clavulánico, incrementó la ingestión por los neutrófilos tanto de la cepa productora como de la no productora de penicilinas. El efecto observado en la cepa de S. aureus no productora de penicilinas parece debido a la actividad intrínseca conjunta de ambos antimicrobianos sobre el

microorganismo, determinando modificaciones estructurales sustanciales que lo harían más susceptible a la fagocitosis, es decir, que aunque de forma aislada ninguno de los dos antimicrobianos, en un periodo de exposición tan corto (4 horas), fuera capaz de mostrar efecto alguno, asociados sí. En el caso de la cepa productora de penicilinas parece que ácido clavulánico desempeñaría más el papel de inactivador de betalactamasas, protegiendo a amoxicilina de la degradación enzimática y permitiéndole así actuar sobre el microorganismo.

Como se ha expuesto anteriormente, los antimicrobianos pueden interaccionar con las células fagocíticas fundamentalmente de dos formas: indirectamente, determinando modificaciones en los microorganismos que hagan que el comportamiento de los PMN frente a los mismos sea distinto o, directamente actuando sobre las funciones de estas células.

Al objeto de conocer si los antimicrobianos incluidos en este estudio ejercían alguna influencia directa sobre los leucocitos PMN, expusimos dichas células a diferentes concentraciones de los antimicrobianos durante 30 minutos, para después estudiar su capacidad de ingestión y los mecanismos bactericidas dependientes de oxígeno, comparándolos con las de neutrófilos no expuestos a los antimicrobianos.

La capacidad de ingestión de S. aureus por los PMN, no se vio influenciada por ninguno de los antimicrobianos ensayados a diferente concentración. La falta de efecto de los betalactámicos sobre la capacidad fagocítica de los leucocitos PMN humanos ya ha sido apuntada por otros autores (24, 49, 55, 95, 96). Por lo que se refiere a los inhibidores de betalactamasa, solos o asociados a betalactámicos, no existen datos en la literatura con los que comparar nuestros resultados.

Los mecanismos bactericidas dependientes del oxígeno, resultan de gran importancia en la destrucción de S. aureus por

parte de los leucocitos PMN, como ha quedado demostrado en los pacientes con Enfermedad granulomatosa crónica. Los PMN de estos enfermos presentan deficiencias en la cadena oxidativa, siendo incapaces de destruir a estos microorganismos una vez que los han ingerido y la traducción clínica de este defecto es el padecimiento de infecciones recidivantes, en las que Staphylococcus aureus juega un papel protagonista (3, 4, 13).

Los mecanismos oxidativos se pueden medir de varias maneras. La actuación de los neutrófilos se asocia a la generación de energía luminosa. Este fenómeno de emisión de luz, conocido con el nombre de quimioluminiscencia, es consecuencia de la generación de radicales tóxicos de oxígeno que se produce en la explosión respiratoria. Esta respuesta puede ser amplificada y medida mediante la adición de un compuesto, el luminol, que emite una luz muy intensa tras ser oxidado por la acción de los metabolitos tóxicos del oxígeno. Los ensayos de quimioluminiscencia son muy difíciles de estandarizar y pueden conducir a la obtención de resultados erróneos (97, 98).

Otra forma de evaluar la explosión respiratoria de las células fagocíticas consiste en medir la producción de aniones superóxido y de peróxido de hidrógeno por dichas células tras ser estimuladas. Entre los distintos métodos descritos en la literatura, elegimos los microensayos descritos por Pick y Mizel (90), con pequeñas modificaciones, por ser técnicas muy sensibles y reproducibles, necesitar muy pequeñas cantidades de reactivos y células y permitir la realización de un gran número de muestras en paralelo. Con estas técnicas hemos evaluado la influencia directa de los antimicrobianos objeto de nuestro estudio sobre los mecanismos bactericidas oxidativos de los leucocitos PMN, tras exponer las células durante 30 minutos a diferentes concentraciones de los mismos.

La incubación de los PMN con amoxicilina, no afectó la producción de radicales superóxido ni de peróxido de hidrógeno.

Duncker y Ullmann observaron un efecto inhibitor con este antimicrobiano, a elevadas concentraciones, sobre la reacción de quimioluminiscencia de los PMN estimulados con zimosan (52). Acido clavulánico y amoxicilina/ácido clavulánico (4/1), sin embargo, redujeron la producción de radicales superóxido por los PMN estimulados con PMA, pero sólo cuando se encontraban a concentraciones mucho más elevadas que las terapéuticas. Estos antimicrobianos no mostraron efecto sobre la producción de peróxido de hidrógeno por los leucocitos PMN.

Ampicilina, a las concentraciones ensayadas no afectó la producción de radicales superóxido ni de peróxido de hidrógeno por los leucocitos PMN. Duncker y Ullmann tampoco encontraron ningún efecto por parte de este antimicrobiano (52), en tanto que otros autores, utilizando también técnicas de quimioluminiscencia han observado un efecto negativo (97, 99). Sulbactam y la combinación ampicilina/sulbactam (2/1) tampoco modificaron la producción de radicales tóxicos de oxígeno por los PMN tras ser estimulados con PMA. La falta de influencia ejercida por sulbactam ya ha sido señalada por distintos investigadores (52, 99), utilizando quimioluminiscencia y una técnica de reducción del ferricitocromo C.

Piperacilina, a la mayor concentración ensayada, y la combinación piperacilina/tazobactam (8/1), a concentraciones de 10 y 100 mg/l, determinaron una reducción significativa en la producción de  $O_2^-$ . La producción de peróxido de hidrógeno, sin embargo, no se vio afectada.

El hecho de que algunos antimicrobianos ejerzan un efecto inhibitor en la producción de radicales tóxicos del oxígeno por las células fagocíticas se podría interpretar en primera instancia como un efecto adverso. Sin embargo, algunos autores consideran que, en determinadas circunstancias, esta característica podría suponer una propiedad ventajosa, pues no se debe olvidar que los productos del metabolismo oxidativo, aunque tienen propiedades antimicrobianas importantes, son

liberados al medio extracelular, y al actuar de forma indiscriminada, pueden resultar tóxicos, causando lesiones celulares y tisulares (100, 101, 102). Se ha demostrado que la activación de la respuesta oxidativa puede comprometer las defensas del huésped, pues presenta un riesgo potencial de inhibición por un mecanismo autooxidativo de las funciones de los neutrófilos (103). Así, pues, el efecto inhibitor ejercido por algunos antimicrobianos sobre el metabolismo oxidativo de los fagocitos, siempre y cuando no interfiera en la capacidad de los neutrófilos para destruir a los microorganismos que han ingerido, podría ser considerado como beneficioso.

La actividad intrafagocítica de los antimicrobianos es un importante factor que contribuye a la muerte intracelular de los patógenos que sobreviven en el interior de las células fagocíticas. S. aureus, bajo ciertas circunstancias, es capaz de sobrevivir en el interior de los fagocitos, siendo este hecho una importante causa de infecciones estafilocócicas persistentes (104).

Los estudios de penetración de los antimicrobianos en las células fagocíticas podrían considerarse como una forma de evaluar la efectividad de los mismos frente a los patógenos intracelulares. Ciertos antimicrobianos, como los betalactámicos y los aminoglucósidos, presentan muy escasa penetración en los PMN, con cocientes C/E  $< 1$  (C/E: concentración intracelular/concentración extracelular). Los antibióticos liposolubles, como rifampicina y cloramfenicol, son capaces de difundir al interior de los fagocitos y concentrarse varias veces, presentando cocientes C/E = 2-5. Compuestos menos liposolubles, como las quinolonas, macrólidos y lincosamidas, también penetran en los PMN, utilizando distintos sistemas de transporte activo, y son los que mayores concentraciones intracelulares alcanzan (C/E = 4-50) (105).

Aunque pueda parecer obvio que para que un antimicrobiano resulte activo frente a un patógeno intracelular debe ser capaz

de penetrar en el interior de las células, no siempre existe correlación entre penetración y actividad intracelular. Así, por ejemplo, se ha observado que antibióticos como clindamicina y eritromicina, capaces de alcanzar muy elevadas concentraciones en el interior de los fagocitos, se muestran sin embargo inefectivos en la destrucción de S. aureus intrafagocítico (56, 106), en tanto que rifampicina, que alcanza menor concentración intracelular que los anteriores, resulta muy eficaz en la destrucción de este patógeno (56, 57). Por otra parte, los experimentos de Hand y King-Thompson con gentamicina (56), y de Van den Broek et al. con benzilpenicilina (107), ponen de manifiesto cómo dos antimicrobianos con escasa capacidad de penetrar en el interior de los PMN, son sin embargo efectivos en la erradicación de S. aureus intracelular. Así pues, para conocer la capacidad de los antimicrobianos de actuar sobre microorganismos intracelulares, los estudios de penetración no resultan adecuados, haciéndose necesaria la realización de estudios de muerte intracelular.

El sistema microbiológico utilizado para evaluar la actividad intracelular de los antimicrobianos incluidos en este estudio frente a S. aureus presenta una serie de limitaciones que deberían ser señaladas. Por una parte, es un método que sería capaz de poner de manifiesto la actividad bactericida de los agentes antimicrobianos, y no su posible efecto bacteriostático, puesto que lo que determina es la reducción en el número de unidades formadoras de colonias (u.f.c.) como indicador de actividad (59). La reducción en el número de u.f.c. puede deberse, además de a la actividad intracelular de los antimicrobianos, a la formación de agregados de varios microorganismos viables como resultado de su exposición a los PMN, siendo esta una eventualidad difícil de excluir, a pesar de todas las precauciones que se tomen a la hora de realizar el ensayo (108). Por eso es necesario realizar los experimentos al menos por duplicado y repetidas veces para poder evaluar los resultados obtenidos (51).

Otra limitación que presenta este sistema es el tiempo. La duración de la exposición de las bacterias intrafagocíticas a los antimicrobianos (3 horas), es relativamente corta, y no representativa de la situación terapéutica, pero hay que tener en cuenta que resulta muy difícil mantener a S. aureus en el interior de los PMN durante períodos de incubación más largos.

Una cuestión muy importante a tener en cuenta en la realización del método es asegurar que cuando se añade el antimicrobiano, la localización de las bacterias sea intracelular, y que el número de bacterias extracelulares sea despreciable, pues en caso contrario, la reducción en el número de u.f.c. podría interpretarse erróneamente como índice de actividad intracelular, debiéndose sin embargo a la acción del antimicrobiano sobre las bacterias de localización extracelular. Algunos autores eliminan S. aureus en su localización extracelular mediante la incubación de las células con lisostafina, antes de añadir el agente antimicrobiano, pero se sabe que la lisostafina es capaz de unirse irreversiblemente a los granulocitos y monocitos, y esta lisostafina unida a las células, no sólo retiene su potencia microbicida, sino que también penetra a través de la pared celular de ambos tipos celulares a 37°C. Esto puede obviarse, no obstante, si la incubación con lisostafina se hace a 4°C. A esta temperatura, la droga mantiene su actividad lítica frente a estafilococo, mientras que deja a los fagocitos intactos (107).

La eliminación de las bacterias extracelulares se puede conseguir también mediante ciclos de lavado con centrifugación diferencial. Este proceder se ha mostrado eficaz para eliminar las bacterias en esta localización incluso las que se encuentran adheridas a la superficie externa de las células fagocíticas, haciendo innecesario el uso de lisostafina (107).

Nuestros resultados revelan que ninguno de los antimicrobianos, solos o asociados, mostró actividad intracelular frente a la cepa de S. aureus productora de

penicilinas en el interior de los PMN. Sólo la combinación amoxicilina/ácido clavulánico (4/1); a la concentración más alta ensayadas (100 mg/l) aumentó de forma significativa la destrucción intracelular de este microorganismo. Este hallazgo probablemente refleja la baja, pero no siempre ausente, penetración de los betalactámicos en el interior de los fagocitos (109, 110).

Por todo lo anteriormente expuesto podemos afirmar que ninguno de los inhibidores de betalactamasas incluidos en este estudio, solos o asociados a aminopenicilinas, afecta de forma directa, a concentraciones dentro del rango terapéutico, las funciones de los PMN humanos, y tampoco muestran una significativa actividad intracelular significativa frente a S.aureus. Sin embargo, ácido clavulánico, sólo o asociado a amoxicilina, podría actuar de forma indirecta sobre el proceso fagocítico, determinando alteraciones sobre la cepa de S. aureus no productora de penicilinas, que la harían más susceptible de ser fagocitadas por los PMN. El mecanismo subyacente a estas alteraciones provocadas por concentraciones subinhibitorias de los antimicrobianos es poco conocido y su posible relevancia in vivo está por demostrar.



## **CONCLUSIONES**

1. La exposición de S.aureus no productor de penicilinas a concentraciones subinhibitorias de amoxicilina y ampicilina incrementó significativamente su fagocitosis por los PMN humanos, tanto en presencia como en ausencia de opsoninas. En el caso de piperacilina sólo se evidenció en bacterias sin opsonizar.
2. La exposición de S.aureus a concentraciones subinhibitorias de ácido clavulánico incrementó significativamente la ingestión bacteriana por los PMN humanos por un mecanismo independiente de la opsonización.
3. A concentraciones subinhibitorias sulbactam y tazobactam no modificaron significativamente la ingestión de S.aureus por los PMN humanos.
4. La preincubación de S.aureus no productor de penicilinas con concentraciones subinhibitorias de amoxicilina/ácido clavulánico incrementó significativamente la ingestión bacteriana, tanto más cuanto mayor era la proporción de ácido clavulánico. La exposición de la cepa de S.aureus productora de penicilinas a concentraciones subinhibitorias de esta asociación incrementó significativamente su fagocitosis cuando se utilizaron tiempos de exposición muy cortos (4 horas).
5. La exposición de S.aureus no productor de penicilinas a concentraciones subinhibitorias de ampicilina/sulbactam incrementó significativamente la ingestión bacteriana por los PMN humanos, tanto más cuanto mayor era la proporción de ampicilina. La asociación piperacilina/tazobactam sólo mostró este efecto sobre bacterias sin opsonizar.

6. Ninguna de las combinaciones utilizadas de ampicilina/sulbactam o piperacilina/tazobactam, a concentraciones subinhibitorias, modificó la ingestión de S.aureus productor de penicilinas.
7. La preincubación de los PMN humanos con concentraciones terapéuticas de los tres inhibidores de betalactamasas, solos o en combinación con aminopenicilinas, no afectó a su capacidad fagocítica.
8. De las asociaciones de inhibidores de betalactamasas con aminopenicilinas utilizadas, sólo piperacilina/tazobactam (8/1) inhibió la producción de radicales superóxido por los PMN humanos, a concentraciones terapéuticas.
9. Ninguno de los inhibidores de betalactamasas evaluados, solo o asociado a una aminopenicilina, afectó la producción de peróxido de hidrógeno por los PMN humanos.
10. De los antimicrobianos evaluados en este estudio, sólo ácido clavulánico y amoxicilina/ácido clavulánico (4/1), a concentraciones elevadas (100 mg/l), mostraron actividad intracelular significativa frente a S.aureus.
11. Para la evaluación "in vitro" de la influencia de un antimicrobiano sobre la actividad de las células fagocíticas, resulta necesario un estudio completo, abarcando las distintas fases del proceso fagocítico, siendo incorrecta la evaluación de una sola función, pues podría dar lugar a interpretaciones erróneas.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Klebanoff, S.J., Clark, R.A. The neutrophil: function and clinical disorders. North Holland Publishing, Amsterdam. 1978.
2. Wade, B.H., Mandell, G.L. Polymorphonuclear Leukocytes: dedicated professional phagocytes. Am. J. Med. 74: 686-693. 1983.
3. Lehrer, R.I., Ganz, T., Selsted, M.E., Babior, B.M., Curnette, J.T. Neutrophils and Host Defense. Annals of Internal Medicine. 109: 127-142. 1988.
4. Sawyer, D.W., Donowitz, G.R., Mandell, G.L. Polymorphonuclear neutrophils: an effective antimicrobial force. Rev. Infect. Dis. 11 (supl. 7): 1532-1544. 1989.
5. Peterson, P.K., Verhoef, J., Sabath, L.D., Quie, P.G. Extracellular and bacterial factors influencing staphylococcal phagocytosis and Killing by human polymorphonuclear Leukocytes. Infect. Immun. 14: 496-501. 1976.
6. Wheat, L.J., Humphreys, D.W., White, A. Opsonization of staphylococci by normal human sera: The role of antibody and heatlabile factors. J. Lab. Clin. Med. 83: 73-78. 1974.
7. Verbrugh, H.A., Van Dijk, W.C., Peters, R., Van Ern, M.E., Daha, M.R., Peterson, P.K., Verhoef, J. Opsonic recognition of staphylococci mediated by cell wall peptidoglycan: antibody-independent activation of human complement and opsonic activity of peptidoglycan antibodies. J. Immunol. 124: 1167-1173. 1980.
8. Babior, B.M. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. N. Engl. J. Med. 298: 659-668, 721-725. 1978.

9. Root, R.K., Cohen, M.S. The microbicidal mechanisms of human neutrophils and eosinophils. *Rev. Infect. Dis.* 3: 365-398. 1981.
10. Thomas, E.L., Grisham, M.B., Jefferson, M.M. Myeloperoxidase-dependent effect of amines on functions of isolated neutrophils. *J. Clin. Invest.* 72: 441-454. 1983.
11. Tauber, A.I., Babior, B.M. Evidence for hydroxyl radical production by human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 60: 374-379. 1977.
12. Biemond, P., Van Eijk, H.G., Swaak, A.J., Koster, J.F. Iron mobilization from ferritin by superoxide derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes: possible mechanism in inflammation diseases. *J. Clin. Invest.* 73: 1576-1579. 1984.
13. Clark, R.A. The human neutrophil respiratory burst oxidase. *J. Infect. Dis.* 161: 1140-1147. 1990.
14. Hauser, W.E., Remington, J.S. Acción de los antibióticos sobre la respuesta inmunitaria. *Am. J. Med.* 72: 711-716. 1982.
15. Peterson, P.K. How antibiotics augment host defenses. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 1: 335-337. 1982.
16. Mandell, L.A. Effects of antimicrobial and antineoplastic drugs on the phagocytic and microbicidal function of the polymorphonuclear leukocyte. *Rev. Infec. Dis.* 4: 683-697. 1982.
17. Milatovic, D. Antibiotics and phagocytosis. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 2: 414-425. 1983.
18. Daschner, F.D. Antibiotics and host defence with special

- reference to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *J. Antimicrob. Chemother.* 16: 135-141. 1985.
19. Gemmell, C.G. Potentiation of phagocytosis of pathogenic bacteria by exposure to low concentrations of antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 13: 407-409. 1984.
  20. Lorian, V. Low concentrations of antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 15 (supp. A): 15-26. 1985.
  21. Lorian, V., Atkinson, B. Abnormal forms of bacteria produced by antibiotics. *Am. J. Clin. Pathol.* 64: 678-688. 1975.
  22. Lorian, V. Some effect of subinhibitory concentrations of penicillin on the structure and division of staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7: 864-870. 1975.
  23. Mc Donald, P.J., Wetheral, B.L. Pruell, H. Postantibiotic leukocyte enhancement: increased susceptibility of bacteria pretreated with antibiotics to activity of leukocytes. *Rev. Infect. Dis.* 3: 38-44. 1981.
  24. Root, R.K., Isturiz, R., Molavi, A., Metcalf, J.A. and Malech, H.L. Interactions between antibiotics and human neutrophils in the killing of staphylococci. Studies with normal and cytochalasin B-treated cells. *J. Clin. Invest.* 67: 247-259. 1981.
  25. Bassler, M., Blaschke, H., Just, M., Daschner, F.D. Effect of ceftriaxone on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in broth, serum, and in combination with human polymorphonuclear leukocytes. *Chemotherapy (Basel)*. 28: 390-396. 1982.
  26. Bassler, M., Depuis, W., Utz, E., Just, H.M., Daschner, F.D. Effect of azlocillin and piperacillin in

- subinhibitory and inhibitory concentrations of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa in broth, in serum and in the presence of human polymorphonuclear leukocytes. Eur. J. Clin. Microbiol. 2: 439-444. 1983.
27. Lam, C., Georgopoulos, A., Laber, G. and Schütze, E. Therapeutic relevance of penicillin induced hypersensitivity of Staphylococcus aureus to killing by polymorphonuclear leukocytes. Antimicrob. Agents Chemother. 26: 149-154. 1984.
28. Labro, M.T., Pochet, I., Babin-Chevaye, C., Hakin, J. Effect of ceftriaxone-induced alterations of bacteria on neutrophil bactericidal function. J. Antimicrob. Chemother. 20: 857-869. 1987.
29. Adinolfi, L.E., Bonventre, P.F. Enhanced phagocytosis, killing, and serum sensitivity of Escherichia coli and Staphylococcus aureus treated with sub-MICs of imipenem. Antimicrob. Agents Chemother. 32: 1012-1018. 1988.
30. Tripodi, M.F., Adinolfi, L.E. Utili, R. Marrone, A., Ruggiero, G. Influence of subinhibitory concentrations of loracarbef (LY 163892) and daptomycin (LY 146032) on bacterial phagocytosis, killing and serum sensitivity. J. Antimicrob. Chemother. 26: 491-501. 1990.
31. García, J., Pascual, A., Conejo, M.C., Perea, E.J. Efecto de cefpodoxima en la interacción entre los neutrófilos humanos y Staphylococcus aureus. Revista Española de Quimioterapia. 4: 53-57. 1991.
32. Horne, D., Tomasz, A. Hypersusceptibility of penicillin-treated Group B streptococci to bactericidal activity of human polymorphonuclear leukocytes. Antimicrob. Agents Chemother. 19: 745-753. 1981.



33. Milatovic, D. Influence of subinhibitory concentrations of antibiotics on opsonization and phagocytosis of Pseudomonas aeruginosa by human polymorphonuclear leukocytes. Eur. J. Clin. Microbiol. 3: 288-293. 1984.
34. Labro, M.T. and Benna, J. Comparison of cefodizime with various cephalosporins for their indirect effect on the human neutrophil oxidative burst in vitro. J. Antimicrob. Chemother. 26 (suppl. C): 49-57. 1990.
35. Kadurugamuwa, J.L., Anwar, H., Brown, M.R. and Zark, O. Protein antigens of encapsulated Klebsiella pneumoniae surface exposed after growth in the presence of subinhibitory concentrations of cephalosporins. Antimicrob. Agents Chemother. 28: 195-199. 1985.
36. Gemell, C.G., Peterson, P.K., Schmeling, D. et al. Potentiation of opsonization and phagocytosis of Streptococcus pyogenes following growth in the presence of clindamycin. J. Clin. Invest. 67: 1249-1256. 1981.
37. Milatovic, D., Braveny, I., Verhoef, J. Clindamycin enhances opsonization of Staphylococcus aureus. Antimicrob. Agents Chemother. 24: 413-417. 1983.
38. Gemmell, C.G. and O'Dowd, A. Regulation of protein A biosynthesis in Staphylococcus aureus by certain antibiotics: its effect on phagocytosis by leukocytes. J. Antimicrob. Chemother. 12: 587-597. 1983.
39. Pruul, H., Wetherall, B., Mc Donald, P. In vitro killing of erythromycin-exposed Group A Streptococci by polymorphonuclear leukocytes. Eur. J. Clin. Microbiol. 5: 405-410. 1986.
40. Veringa, E., Verhoef, J. Influence of subinhibitory concentrations of clindamycin on opsonophagocytosis of

- Staphylococcus aureus, a protein-A dependent process. Antimicrob. Agents Chemother. 30: 796-797. 1986.
41. Pascual, A., López-López, G., Aragón, J., Perea, E.J. Effect of azithromycin, roxithromycin and erythromycin on human polymorphonuclear leukocyte function against Staphylococcus aureus. Chemotherapy (Basel).36: 422-427. 1990.
  42. Majeski, J.A. and Alenxander, J.W. Evaluation of tetracycline in the neutrophil chemotactic response. J. Lab. Clin. Med. 90: 259-265. 1977.
  43. Gnarpe, H., Belsheim, J. and Persson, S. Tetracycline interference with leukocyte chemotaxis in vitro and in vivo. Infection 6 (suppl. 1): 98. 1978.
  44. Gnarpe, H. and Belsheim, J. Direct and indirect effects os antibiotics on granulocyte activity. J. Antimicrob. Chemother. 8 (Suppl. C): 71-75. 1981.
  45. Seklecki, M.M., Quintiliani, R. and Maderazo, G.G. Aminoglycoside antibiotics moderately impair granulocyte function. Antimicrob. Agents. Chemother. 13: 552-554. 1978.
  46. Belsheim, J.A. and Gnarpe, G.H. Antibiotics and granulocytes. Direct and indirect effects on granulocyte chemotaxis. Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica (C) 89: 217-221. 1981.
  47. Burgaleta, C., Martínez-Beltrán, J. and Bouza, E. Comparative effects of moxalactam and gentamicin on human polymorphonuclear function. Antimicrob. Agents Chemother. 21: 718-720. 1982.
  48. Fietta, A., Sacchi, F., Bersani, C., Grassi, F.,

- Mangiarotti, P. and Grassi, G. Effect of  $\beta$ -lactam antibiotics on migration and bactericidal activity of human phagocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23: 930-931. 1983.
49. Labro, M.T. Babin-Chevaye, C. and Hakim J. Effects os cefotaxime and cefodizime on human granulocyte functions in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* 18: 233-237. 1986.
50. Labro, M.T., Babin-Chevaye, C., Pochet, J. and Hakim, J. Interaction of ceftriaxone with human polymorphonuclear neutrophil function. *J. Antimicrob. Chemother.* 20: 849-855. 1987.
51. Verhoef, J., Waldvogel, F.A. Testing phagocytic cell function. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 4: 379-391. 1985.
52. Duncker, D., Ullmann, U. Influence of various antimicrobial agents on the chemiluminescence of phagocytosing human granulocytes. *Chemotherapy.* 32: 18-24. 1986.
53. Labro, M.T., Amit, N., Babin-Chevaye, C. and Hakim, J. Cefodizime (HR-221) potentiation of human neutrophil oxygen-independent bactericidal activity. *J. Antimicrob. Chemother.* 19: 331-341. 1987.
54. Labro, M.T. and El Benna, J. Synergistic bactericidal interaction of josamycin with human neutrophils in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* 26: 515-524. 1990.
55. Van der Auwera, P., Husson, M., Frühling, J. Influence of various antibiotics on phagocytosis of Staphylococcus aureus by human polymorphonuclear leuocytes. *J. Antimicrob. Chemother.* 20: 399-404. 1987.
56. Hand, W.L., King-Thompson, N.L. Contrast between phagocyte

- antibiotic uptake and subsequent intracellular bactericidal activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 135-140. 1986.
57. Mandell, G.L. and Vest, T.K. Killing of intraleukocytic Staphylococcus aureus by rifampin: in vitro and in vivo studies. *J. Infect. Dis.* 125: 486-490. 1972.
58. Milatovic, D. Intraphagocytic activity of erythromycin, roxithromycin and azithromycin. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9: 33-35. 1990.
59. Anderson, R., Joone, G., Van Rensburg, C.E.J. An in vitro investigation of the intracellular bioactivity of amoxicillin, clindamycin and erythromycin for Staphylococcus aureus. *J. Infect. Dis.* 153: 593-600. 1986.
60. Traub, W.H. Intraphagocytic bactericidal activity of DNA gyrase inhibitors against Serratia marcescens. *Chemotherapy.* 30: 379-386. 1984.
61. Easmon, C.S.F., Grane, J.P. Uptake of ciprofloxacin by macrophages. *J. Clin. Pathol.* 38: 442-444. 1985.
62. Pascual, A., García, J., Perea, E.J. Fluorometric measurement of ofloxacin uptake by human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 653-656. 1989.
63. Miller, T.E. Host defence mechanisms, antibiotics and immunosuppressive agents. A complex relationship. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 3: 285-287. 1984.
64. Bush, K.  $\beta$ -lactamase inhibitors from laboratory to clinic. *Clinical Microbiology Reviews.* 1: 109-123. 1988
65. Wong, C. Beta lactamase inhibitors. *Clinical Microbiology*

Newsletter. 10: 177-180. 1988.

66. Sanders, C.C., Sanders, W.E. Jr. Emergence of resistance during therapy with the newer  $\beta$ -lactam antibiotics: role of inducible  $\beta$ -lactamases and implications for the future. Rev. Infect. Dis. 5: 639-648. 1983.
67. Collatz, E., Gutmann, L., Williamson, R., Acar, J.F. Development of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics with special reference to third-generation cephalosporins. J. Antimicrob. Chemother. 14 (suppl. B): 13-21. 1984.
68. Milatovic, D., Braveny, I. Development of resistance during antibiotic therapy. Eur. J. Clin. Microbiol. 6: 234-244. 1987.
69. Sanders, W.E., Jr. and Sanders, C.C. Inducible  $\beta$ -lactamases: clinical and epidemiologic implications for use of newer cephalosporins. Rev. Infect. Dis. 10: 830-838. 1988.
70. Wise, R.  $\beta$ -lactamase inhibitors. J. Antimicrob. Chemother. 9 (Suppl. B): 31-40. 1982.
71. Reading, C., and Cole, M. Clavulanic acid: a betalactamase inhibiting beta-lactam from Streptomyces clavuligerus. Antimicrob. Agents Chemother. 11: 852-857. 1977.
72. Bush, K. Classification of  $\beta$ -lactamases: groups 1, 2a, 2b, and 2b'. Antimicrob. Agents Chemother. 33: 264-270. 1989.
73. Bush, K. Classification of  $\beta$ -lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3 and 4. Antimicrob. Agents Chemother. 33: 271-276. 1989.
74. Aronoff, E.C., Jacobs, M.R., Jøhanning, S. and Yamabe, S. Comparative activities of the  $\beta$ -lactamase inhibitors YTR-

- 830, sodium clavulanate and sulbactam combined with amoxicillin or ampicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26: 580-582. 1984.
75. Gutmann, L. Kitzis, M.D., Yamabe, S. and Acar, J.F. Comparative evaluation of a new  $\beta$ -lactamase inhibitor, YTR-830, combined with different  $\beta$ -lactam antibiotics against bacteria harborin known  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 955-957. 1986.
76. Kuck, N.A., Jacobus, N.V., Petersen, P.J., Weiss, W.J., and Testa, R.T. Comparative in vitro and in vivo activities of piperacillin combined with the  $\beta$ -lactamase inhibitors tazobactam, clavulanic acid, and sulbactam. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1964-1969. 1989.
77. Akova, M., Yang, Y. and Livermore, D.M. Interactions of tazobactam and clavulanate with inducibly - and constitutively- expressed class I  $\beta$ -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 25: 199-208. 1990.
78. Moosden, F. Keeble, J., Williams, J.D. Induction/inhibition of chromosomal  $\beta$ -lactamases by  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Rev. Infect. Dis.* 8 (Suppl. 5): 5562-5568. 1986.
79. Livermore, D.M., Akova, M., Wu, P., Yang, Y. Clavulanate and  $\beta$ -lactamase induction. *J. Antimicrob. Chemother.* 24 (Suppl. B): 23-33. 1989.
80. Kitzis, M.D., Ferré, B., Coutrot, A., Acar, J.F., Gutmann, L. In vitro activity of combinations of beta-lactam antibiotics with beta-lactamase inhibitors against cephalosporinase-producing bacteria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8: 783-788. 1989.
81. Corkill, J.D., Hart, C.A. Poor induction of  $\beta$ -lactamases

- by tazobactam. *J. Antimicrob. Chemother.* 25: 477-479. 1990.
82. Farmer, T.H. and Reading, C. The effects of clavulanic acid and sulbactam on  $\beta$ -lactamase biosynthesis. *J. Antimicrob. Chemother.* 22: 105-111. 1988.
83. Kloos, W.E. and Jorgensen, J.H. *Staphylococci*, p. 143-152. En Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, Jr., W.J., Shadomy, H.J. *Manual of clinical microbiology*, 4<sup>th</sup> ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1985.
84. O'Callaghan, C.H., Morris, A., Kirby, S.M. et al. Novel method for detection of betalactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1: 283-288. 1972.
85. Jones, R.N., Barry, A.L., Gavan, T.L., Washington II, J.A. Susceptibility tests: microdilution and macrodilution broth procedures, p. 972-977. En Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, Jr. W.J., Shadomy, H.J. *Manual of clinical microbiology*, 4<sup>th</sup> ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1985.
86. Barry, A.L. and Thornsberry, C. Susceptibility test: diffusion test procedures, p. 978-987. En Lennete, E.H., Balows, A., Hausler, Jr. W.J., Shadomy, H.J. *Manual of clinical microbiology*, 4<sup>th</sup> ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1985.
87. Boyüm, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes, and macrophages. *Scand. J. Immunol. Suppl.* 5: 9-15. 1976.
88. Vergrugh, H.A., Peters, R., Peterson, P.K., Verhoef, J. Phagocytosis and intracellular killing of staphylococci by polymorphonuclear and mononuclear leukocytes. *J. Clin. Pathol.* 31: 539-544. 1978.

89. Verhoef. J., Peterson, P.K., Quie, P.G. Kinetics of Staphylococcal opsonization, attachment, ingestion and killing by human polymorphonuclear leukocytes: a quantitative assay using (<sup>3</sup>H)- thymidine- labelled bacteria. Journal of Immunological Methods. 14: 303-311. 1977.
90. Pick, E. and Mizel, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. Journal of Immunological Methods. 46: 211-226. 1981.
91. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 193: 265-275. 1951.
92. Pascual, A., Tsukayama, D., Kovarik, J. et al. Uptake and activity of rifapentine in human peritoneal macrophages and polymorphonuclear leukocytes. Eur. J. Clin. Microbiol. 6: 152-157. 1987.
93. Labro, M.T., El Benna, J. Effects of anti-infections agents on polymorphonuclear neutrophils. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 10: 124-131. 1991.
94. Milatovic, D. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on the phagocytosis of Staphylococcus aureus. Eur. J. Clin. Microbiol. 1: 97-101. 1982.
95. Melby, K. and Midtvedt. Effects of some antibacterial agents on the phagocytosis of <sup>32</sup>P- labelled Escherichia coli by human polymorphonuclear cells. Acta path. microbiol. scand. Sect. B. 88: 103-106. 1980.
96. Burgaleta, C. and Moreno, T. Effect of  $\beta$ -lactams and aminoglycosides on human polymorphonuclear leucocytes. J.

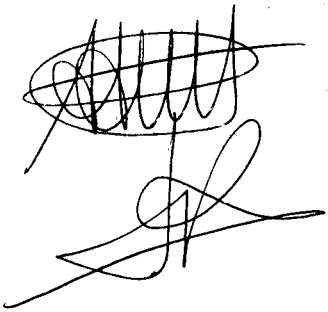


- Antimicrob. Chemother. 20: 529-535. 1987.
97. Briheim, G. Stendahl, O., Dahlgren, C. Influence of antibiotics on formylmethionyl-leucyl-phenylalanine-induced leukocyte chemiluminescence. Antimicrob. Agents Chemother. 31: 763-767. 1987.
98. Van der Auwera, P. In-Vitro test of the functions of phagocytic cells and their interaction with antimicrobial agents: a critical view. J. Antimicrob. Chemother. 26: 168-172. 1990.
99. Santo, J.I. and Arbo, A. The in vitro effect of sulbactam on polymorphonuclear leukocyte function. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 12: 147S-152S. 1989.
- 100 Babior, B.M. Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. Blood. 64: 959-966. 1984.
- 101 Anderson, R. Erythromycin and Roxithromycin potentiate human neutrophil locomotion in vitro by inhibition of leukoattractant-activated superoxide generation and autoxidation. J. Infect. Dis. 159: 966-973. 1989.
- 102 Hand, W.L., Hand, D.L. and King-Thompson, N.L. Antibiotic inhibition of the respiratory burst response in human polymorphonuclear leukocytes. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 863-870. 1990.
- 103 Maderazo, E.G., Woronick, C.L., Albano, S.D., Breaux, S.P., Pock, R.M. Inappropriate activation, deactivation, and probable autooxidative damage as a mechanism of neutrophil locomotory defect in trauma. J. Infect. Dis. 154: 471-477. 1986.
- 104 Buggy, B.P., Schaberg, D.R., Swartz, R.D. Intraleukocyte sequestration as a cause of persistent Staphylococcus

- aureus peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis. Am. J. Med. 76: 1035-1040. 1984.
- 105 Hand, W.L. Antibiotics and phagocytic cells. The Antimicrobial Newsletter. 5: 53-60. 1988.
- 106 Steinberg, T.H., Hand, W.L. Effect of phagocyte membrane stimulation on antibiotic uptake and intracellular bactericidal activity. Antimicrob. Agents Chemother. 31: 660-662. 1987.
- 107 Van den Broek, P.J., Buys, L.F.M. and Aleman, B.M.P. The antibacterial activity of benzylpenicillin against Staphylococcus aureus ingested by granulocytes. J. Antimicrob. Chemother. 25: 931-940. 1990.
- 108 Dugger, K.O. and Galgiani, J.N. Neutrophil Killing of single microorganisms as measured by a new method. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 12: 199-203. 1989.
- 109 Prockesh, R.C., Hand, W.L. Antibiotic entry into human polymorphonuclear leukocytes. Antimicrob. Agents Chemother. 21: 373-380. 1982.
- 110 Tulkens, P.M. Intracellular distribution and activity of antibiotics. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 10: 100-106. 1991.

M. del Carmen Cornejo Gonzado  
Efecto de los Inhibidores de  $\beta$ -Lactamidas  
en la actividad de los leucocitos Polimorfo nucleares  
humanos.

APTO, CUM LAUDE



||

Febrero

92

