

11/11/72

UNIVERSIDAD DE SEVILLA.  
FACULTAD DE MEDICINA.  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA.

TESIS DOCTORAL

Descripción de un Nuevo Método  
Espectrofotométrico de  
Determinación del Efecto  
Postantibiótico

✓

M<sup>a</sup> Carmen Domínguez Jiménez  
- 1996 -

A mi enamorado, Agustín

61

79

Fleura Laflotte

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente al Servicio de Microbiología de los Hospitales " Virgen de las Nieves " de Granada y " Virgen Macarena " de Sevilla y muy especialmente a mis directores, el Dr. D. Manuel de la Rosa y la Dra. Dña. M<sup>a</sup> Victoria Borobio, personas a las que por otra parte admiro, la labor que han realizado y su ayuda en el desarrollo y maduración de esta Tesis Doctoral de la que estoy muy satisfecha.

Al Profesor Evelio Perea reitero mi gratitud, por haberme facilitado realizar en su día mi Tesis de Licenciatura y ahora Doctoral, en su Departamento.

Al Dr. Juan Carlos Alados por su colaboración en la génesis de esta Tesis y por su apoyo bibliográfico.

Por último, dedico un recuerdo a los amigos y compañeros dejados a uno y otro lado de Andalucía, con los que tantos ratos buenos he pasado y a Yolanda Partal, compañera de fatigas en el estudio del Efecto Postantibiótico.

INDICE

1.1.Concepto de efecto postantibiótico (EPA).....	1
1.1.1.Definición clásica	
1.1.2.Definición del EPA basada en la alteración de la cinética de crecimiento	
1.2.Mecanismos del EPA.....	6
1.3.Factores que afectan al EPA.....	8
1.3.1.Tipo de microorganismo y antimicrobiano estudiado	
1.3.2.Tamaño del inóculo	
1.3.3.Fase de crecimiento del microorganismo	
1.3.4.Concentración del antimicrobiano	
1.3.5.Duración de la exposición	
1.3.6.Combinaciones antimicrobianas	
1.3.7.Post-exposición a concentraciones subinhibitorias	
1.3.8.Tipo de medio	
1.3.9.pH	
1.3.10.Agitación mecánica	
1.4.Determinación del EPA "in vitro".....	16
1.4.1.Eliminación del antimicrobiano	
1.4.2.Seguimiento de la cinética de crecimiento bacteriano	
1.4.2.1.Recuentos viables	
1.4.2.2.Espectrofotometría	
1.4.2.3.Nefelometría	
1.4.2.4.Bioluminiscencia	
1.4.2.5.Adaptación del sistema BACTEC	
1.4.2.6.Métodos radiométricos	
1.4.2.7.Enumeración microscópica	
1.4.2.8.Contaje eléctrico	
1.4.2.9.Impedancia eléctrica	

1.5.Determinación del EPA "in vivo".....	26
1.6.Significado biológico del EPA.....	29
1.6.1.Aumento de la susceptibilidad bacteriana a los leucocitos en fase postantibiótica	
1.6.2.Disminución de la actividad bactericida en la fase postantibiótica	
2.-OBJETIVOS DEL ESTUDIO	32
3.-MATERIAL Y METODOS	33
3.1.-MATERIAL	33
3.1.1.Cepas bacterianas	
3.1.2.Agentes antimicrobianos	
3.1.3.Medios	
3.1.3.1.Medios de cultivo	
3.1.3.2.Medio de dilución para recuentos viables	
3.1.4.Equipo de medición	
3.1.5.Incubador-agitador	
3.1.6.Equipo de contaje de colonias	
3.1.7.Colorantes	
3.2.-METODOS	38
3.2.1.Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria ( CMI )	
3.2.1.1.CMI por dilución en caldo	
3.2.1.2.CMI por dilución en agar	

- 3.2.2.Determinación de la cinética de crecimiento bacteriano
  - 3.2.2.1.Cinética del crecimiento bacteriano
  - 3.2.2.2.Medida del crecimiento bacteriano usando recuentos viables
  - 3.2.2.3.Medida del crecimiento bacteriano por espectrofotometría
  - 3.2.2.4.Cálculo gráfico del tiempo de generación
  - 3.2.2.5.Ajuste de una curva espectrofotométrica a la dinámica de crecimiento
- 3.2.3.Cálculo del EPA a partir de los datos de crecimiento bacteriano
- 3.2.4.Determinación fotométrica del efecto postantibiótico
  - 3.2.4.1.Preparación del inóculo
  - 3.2.4.2.Preparación del tubo control
  - 3.2.4.3.Exposición al agente antimicrobiano
  - 3.2.4.4.Eliminación del agente antimicrobiano
  - 3.2.4.5.Determinación del efecto del agente antimicrobiano
  - 3.2.4.6.Cálculo del efecto multinucleo
  - 3.2.4.7.Monitorización espectrofotométrica del crecimiento bacteriano
  - 3.2.4.8.Recuentos bacterianos en agar
  - 3.2.4.9.Representación gráfica del cálculo del EPA
  - 3.2.4.10.Cálculo del Efecto Postantibiótico
  - 3.2.4.11.Validación del cálculo del tiempo de generación
  - 3.2.4.12.Relación D.O. (Absorbancia) - Recuentos Viables
  - 3.2.4.13.Determinación del EPA por recuentos viables
  - 3.2.4.14.Comparación método clásico y método espectrofotométrico
  - 3.2.4.15.Eficacia del método de dilución para la eliminación del antibiótico
  - 3.2.4.16.Influencia de la dilución sobre la cinética de crecimiento

4.-RESULTADOS	90
4.1.CMI.....	90
4.2.Ensayos con <i>Escherichia coli</i> .....	93
4.2.1. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 : Validación del cálculo espectrofotométrico del EPA	
4.2.1.1.Cálculo del tiempo de generación	
4.2.1.2. <i>E.coli</i> ATCC 25922 - gentamicina: Ensayos de validación	
4.2.1.3. <i>E.coli</i> ATCC 25922 - ciprofloxacino: Ensayos de validación	
4.2.1.4. <i>E.coli</i> ATCC 25922 - ceftriaxona: Ensayos de validación	
4.2.1.5. <i>E.coli</i> ATCC 25922 - piperacilina: Ensayos de validación	
4.2.1.6. <i>E.coli</i> ATCC 25922 - imipenem: Ensayos de validación	
4.2.2. <i>Escherichia coli</i> 304	
4.2.3. <i>Escherichia coli</i> 347	
4.3.Ensayos con <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	129
4.3.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 : Validación del cálculo espectrofotométrico del EPA	
4.3.1.1.Cálculo del tiempo de generación	
4.3.1.2. <i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853 - gentamicina: Ensayos de validación	
4.3.1.3. <i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853 - ciprofloxacino: Ensayos de validación	
4.3.1.4. <i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853 - ceftriaxona: Ensayos de validación	

4.3.1.5.	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853 - imipenem: Ensayos de validación	
4.3.2.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 251	
4.3.3.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 276	
4.4.	Ensayos con <i>Staphylococcus aureus</i> .....	157
4.4.1.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 : Validación del cálculo espectrofotométrico del EPA	
4.4.1.1.	Cálculo del tiempo de generación	
4.4.1.2.	<i>S.aureus</i> ATCC 29213 - gentamicina: Ensayos de validación	
4.4.1.3.	<i>S.aureus</i> ATCC 29213 - ciprofloxacino: Ensayos de validación	
4.4.1.4.	<i>S.aureus</i> ATCC 29213 - ceftriaxona: Ensayos de validación	
4.4.2.	<i>Staphylococcus aureus</i> 356	
4.4.3.	<i>Staphylococcus aureus</i> 360	
5.-	<b>DISCUSION</b>	<b>176</b>
6.-	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>200</b>
7.-	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>202</b>

## INTRODUCCION

## 1.- INTRODUCCION

### 1.1.CONCEPTO DE EFECTO POSTANTIBIOTICO

#### 1.1.1. DEFINICION CLASICA

El efecto postantibiótico (EPA), es el fenómeno de supresión o enlentecimiento del crecimiento bacteriano tras una corta exposición a un agente antimicrobiano que posteriormente es eliminado del cultivo. Esta definición enfatiza que este efecto es debido a la exposición al antibiótico y no a la acción de concentraciones subinhibitorias (McDonald et al., 1977); (Craig WA & Gudmundsson S, 1986); (Vogelman BS & Craig WA, 1985); (Craig WA, 1991); (Bundtzen et al., 1981).

#### 1.1.2. DEFINICION DEL EPA BASADA EN LA ALTERACION DE LA CINETICA DE CRECIMIENTO

Otro concepto de efecto postantibiótico, aunque con la misma interpretación, fue dado por Rescott et al. en 1988 y Jason et al. en 1994, definiéndolo como el aumento de la fase lag o periodo de recuperación del crecimiento bacteriano después de una corta exposición al antibiótico a una concentración subletal.

En general se utilizan para el cálculo del EPA cultivos bacterianos en fase logarítmica ( exponencial ) donde la representación gráfica del logaritmo del número de bacterias (UFC/ml) frente al tiempo es una recta ( **Figura 1** ) (Sección 3.2.2.1.).

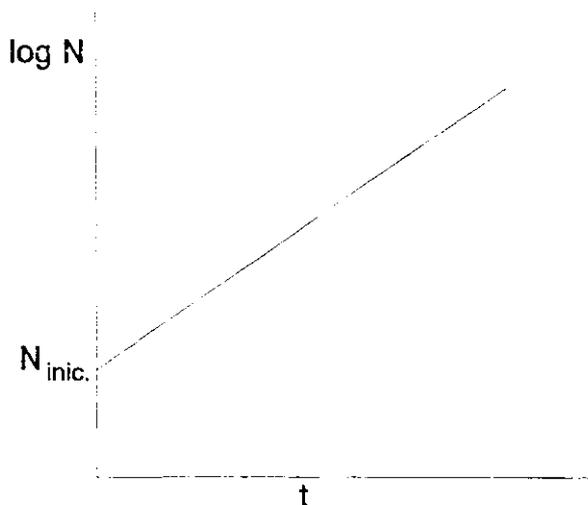


Figura 1.- Representación gráfica del logaritmo del número de bacterias (log N) frente al tiempo (t)

Con efectos prácticos se considera que se ha recuperado la dinámica normal de crecimiento, cuando las curvas de crecimiento del cultivo pretratado, una vez eliminado el antibiótico y de un cultivo análogo sin tratar (control), vuelven a hacerse paralelas.

Así mismo se estima que el efecto residual del antibiótico utilizado desaparece, después de eliminar el antibiótico del medio, al cabo de la sucesión de más de tres generaciones bacterianas ( $2^3$ ) ó, lo que es equivalente, cuando el número de bacterias en el cultivo aumente 10 ( $10 = 2^{3.33}$ ) ó más veces, ó 1 ó más logaritmo<sub>10</sub>.

Sea C, el tiempo en que un cultivo en fase exponencial de crecimiento considerado en un tiempo inicial ( $t_{inic}$ ), aumenta su número de bacterias (UFC/ml) desde un número inicial  $N_{inic}$  hasta  $10N_{inic}$  ( Figura 2 ).

Sea  $T$ , el tiempo en que el mismo cultivo (una alícuota) tratado con un antibiótico ( durante un tiempo  $-t_{\text{expo}}$  ) que ha alterado su número inicial de bacterias de  $N_{\text{inic}}$  a  $N_{\text{anti}}$ , aumenta su concentración de bacterias desde  $N_{\text{anti}}$  a  $10N_{\text{anti}}$  (donde ya se supone que ha recuperado el crecimiento exponencial).

Entonces definimos el EPA como

$$\text{EPA} = T - C \quad (1)$$

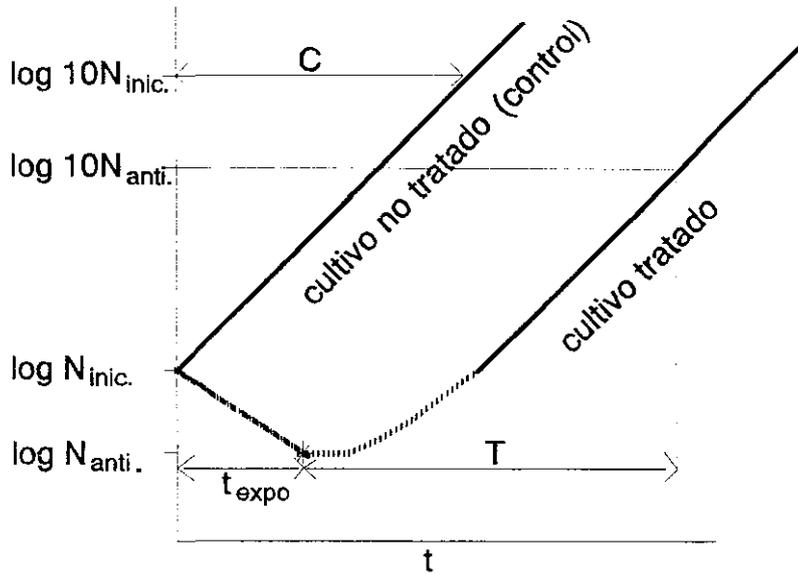


Figura 2.- Representación gráfica teórica de una experiencia de determinación de EPA

\* Eliminación del antibiótico

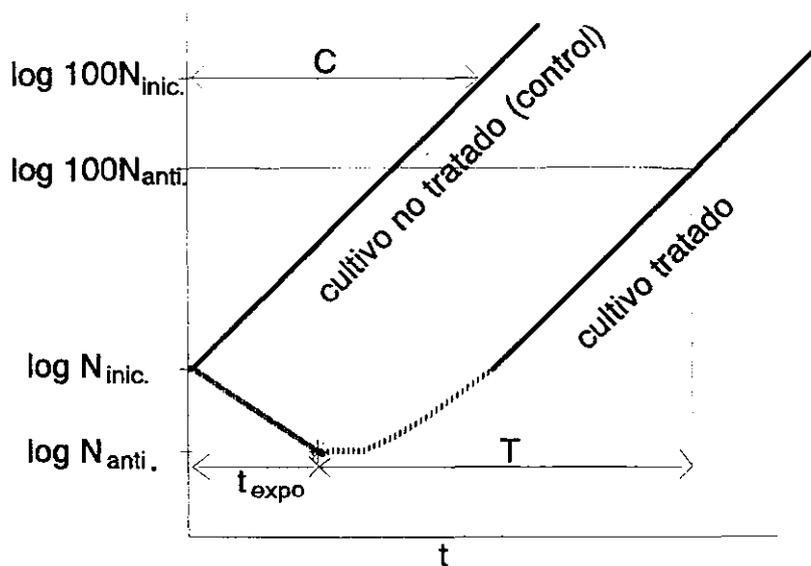
----- Acción subletal del antibiótico durante el tiempo de exposición

..... Recuperación de la dinámica normal de crecimiento

C, tiempo en que el cultivo sin tratar incrementa su densidad desde  $N_{inic}$  a  $10N_{inic}$

T, tiempo en que el cultivo tratado y después de eliminar el antibiótico, incrementa su densidad desde  $N_{anti}$  a  $10N_{anti}$

Análogos resultados obtendríamos si  $C$ , se definiera como el tiempo de crecimiento del cultivo control desde  $N_{inic}$  a  $100N_{inic}$  y  $T$ , como el tiempo de cambio del cultivo tratado desde  $N_{anti}$  a  $100N_{anti}$  ( **Figura 3** ) ó  $C$ , el tiempo de cambio desde  $N_{inic}$  a  $1000N_{inic}$  y  $T$ , como el tiempo de variación desde  $N_{anti}$  a  $1000N_{anti}$  ( **Figura 4** ) o cualquier otro aumento superior a 10 veces en los cultivos control y pretratados ( siempre que sea superior al EPA ó tiempo de recuperación de la dinámica normal de crecimiento y la cinética de crecimiento de los cultivos se mantenga en fase exponencial ).



**Figura 3.- Representación gráfica teórica del cálculo del EPA basado en un aumento del número de colonias del cultivo control y tratado de 100 veces**

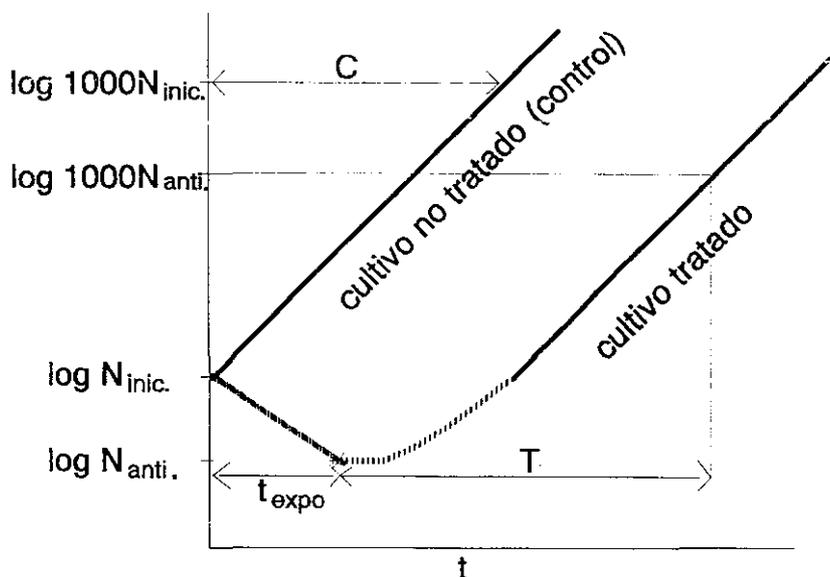


Figura 4.- Representación gráfica teórica del cálculo del EPA basado en un aumento del número de colonias del cultivo control y tratado de 1000 veces

### 1.2.MECANISMOS DEL EPA

Los mecanismos por los cuales los agentes antimicrobianos producen EPAs son desconocidos. Las diferencias observadas en la duración del EPA según las combinaciones droga-organismo, sugieren que están envueltos múltiples procesos. Se sabe que no es debido a la formación de cepas variantes de crecimiento más lento en los cultivos previamente expuestos al antibiótico, porque las curvas de crecimiento del cultivo control y del expuesto son paralelas una vez que se ha superado el EPA (Craig & Gudmundsson, 1986).

Una de las posibilidades que se barajan es que el EPA pueda ser debido a un daño no letal producido por el agente antimicrobiano en la bacteria (Craig, 1991); (Bundtzen et al.,

1981); como ocurre con los aminoglucósidos (Vogelman & Craig, 1985); (Craig & Vogelman, 1987).

La persistencia limitada de la droga en el sitio de unión bacteriano es otro de los mecanismos propuestos por Craig (1991); Bundtzen et al. ( 1981 ) y Craig & Vogelman ( 1987 ) en este caso referido al EPA de eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol y otros inhibidores ribosómicos, pudiendo representar el tiempo requerido para que estos agentes se disocien de la subunidad del ribosoma y difundan fuera del mismo. En contraposición con esta hipótesis, Gerber & Craig en 1981 observaron que el EPA de eritromicina sobre *Streptococcus pneumoniae* no desaparecía tras una incubación de 24 horas a 4°C, tiempo durante el cual, el antimicrobiano difunde desde los ribosomas incluso fuera de las células.

Por otra parte Craig & Gudmundsson en 1986 postularon que durante la exposición a los antimicrobianos inhibidores de la síntesis proteica o ribonucleica, los microorganismos sufren una merma de las proteínas necesarias para su metabolismo y crecimiento bacteriano y que el EPA representaría el tiempo de resíntesis de estas proteínas.

También resulta difícil explicar el mecanismo del EPA de los  $\beta$ -lactámicos, estos agentes se unen covalentemente a múltiples proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs), algunas de las cuales están envueltas en la síntesis de la pared celular (Spratt, 1978), siendo posible que el EPA refleje el tiempo requerido por la bacteria para sintetizar nuevos enzimas (Craig & Vogelman, 1987); (Lorian et al., 1989). Otra explicación del EPA generado por estas drogas está basada en la observación de que los complejos penicilina-enzima unidos covalentemente pueden romperse, regenerándose moléculas enzimáticas activas que pueden ser reutilizadas en la síntesis de la pared celular (Tomasz, 1979); la velocidad de estos procesos varia según el

microorganismo ( Fuad et al., 1976) así, para algunas enzimas como la D-alanina carboxipeptidasa de *Escherichia coli*, la vida media de los complejos penicilina-enzima es sólo de 2-5 min (Tamura et al., 1976) y por tanto, las diferencias de EPAs de los antibióticos  $\beta$  lactámicos podrían reflejar las diferencias en la velocidad de liberación y regeneración de moléculas enzimáticas activas después que se ha eliminado la droga del medio ( Bundtzen et al., 1981 ); ( Craig, 1991 ); ( Craig & Vogelmann, 1987 ).

### 1.3.FACTORES QUE AFECTAN AL EPA

#### 1.3.1.TIPO DE MICROORGANISMO Y ANTIMICROBIANO ESTUDIADO

La disminución de la velocidad de crecimiento tras una corta exposición a un agente antimicrobiano ha sido observada en una amplia diversidad de bacterias incluyendo cocos Gram positivos ( *Staphylococcus spp.* y *Streptococcus spp.*), bacilos Gram negativos ( *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. maltophilia*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila* ), bacilos Gram positivos ( *Listeria monocytogenes*), micoplasmas ( *Mycoplasma pneumoniae* ), anaerobios ( *Bacteroides grupo fragilis* ), micobacterias ( *Mycobacterium tuberculosis*, *M. fortuitum* ) y hongos ( *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans* ).

Es de suponer que la presencia o ausencia de EPA así como la duración del mismo, varía con las combinaciones organismo - antimicrobiano existiendo múltiples publicaciones que tratan el tema (Craig & Gudmundsson, 1991); (Bundtzen et al., 1981); (Craig & Vogelmann, 1987); (Craig & Mattie, 1986); (Siverhus et al., 1988); (Beggs & Jenne, 1969); (Alarcon y cols., 1990); (Winstanley, 1990); (Kuenzi et al., 1987); (Watanabe et al., 1989); (Dubois et al., 1989); (Van der Auwera & Klastersky, 1987); (Tsui et al., 1993); (Turnidge et al., 1994); (Walsh et al., 1995) etc.

### 1.3.2. TAMAÑO DEL INOCULO

La repercusión del tamaño del inóculo sobre la duración del EPA no está totalmente establecida, la información que existe al respecto es limitada y controvertida.

Hay autores que establecen una relación negativa entre el tamaño del inóculo bacteriano expuesto a la droga y la duración del EPA así, los primeros en realizar esta aseveración fueron Eagle y Musselman que en 1949 observaron la no existencia de EPA con suspensiones muy concentradas de estafilococos expuestos a penicilina G durante 4 horas. Mucho más tarde Craig & Gudmundsson (1986) utilizando una cepa patrón de *Staphylococcus aureus*, observaron el efecto de bajos inóculos ( desde  $1 \times 10^3$  hasta  $3 \times 10^7$  UFC/ml), sobre la duración del EPA de penicilina G y eritromicina, comprobando que el incremento del inóculo se asociaba con sólo ligeros descensos en la duración del EPA de ambas drogas. Sin embargo, en contraposición con los resultados obtenidos por estos autores McDonald et al. en 1977, realizando un estudio similar al anterior, observaron que el EPA era indiferente al tamaño del inóculo.

Craig en 1991 apuntó que grandes inóculos pueden reducir la duración del EPA especialmente con bacilos Gram negativos, corroborando así las investigaciones de Odenholt et al. (1989) con imipenem y *P.aeruginosa* y de Rescott et al. en 1988 con ciprofloxacino, tobramicina y *E.coli*, aunque en este último caso no pudo establecerse la dependencia del inóculo en el EPA de ampicilina. En contraste con esta hipótesis, Mínguez y cols en 1990 estudiando la relación existente entre el factor inóculo bacteriano de *S.aureus*, *E.coli* y *P.aeruginosa* y el EPA de ciprofloxacino, comprobaron que dicho factor no influía para nada en la duración de éste, si bien es verdad, que el rango de inóculos ensayados fue muy estrecho ( de  $10^5$  a  $10^7$  UFC/ml ).

### 1.3.3. FASE DE CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO

Aunque la mayoría de los estudios sobre EPA han sido realizados con organismos en fase logarítmica de crecimiento, las observaciones realizadas por Gerber et al. en 1982 con gentamicina y *P.aeruginosa*, han revelado duraciones similares del EPA tanto con el organismo en fase de retraso del crecimiento como en la de crecimiento logarítmico.

### 1.3.4. CONCENTRACION DEL ANTIMICROBIANO

Desde que Eagle en 1949 estudió la influencia de este factor sobre el efecto postantibiótico, está totalmente aceptado que al aumentar la concentración del antimicrobiano aumenta el EPA hasta llegar a un nivel, que depende del binomio germen-antibiótico, por encima del cual no se prolonga significativamente la duración del EPA ( Wilson & Rolinson, 1979 ); (Craig & Gudmundsson, 1991); ( McDonald et al., 1977 ).

Hay veces que este máximo efecto no se puede determinar por que la droga es muy bactericida a altas concentraciones, esto ocurre por ejemplo con los aminoglucósidos y las quinolonas (Vogelman & Craig, 1986); (Bundtzen et al., 1981); (Vogelman & Craig, 1985); (Mínguez y cols., 1989); (Gudmundsson A. et al., 1991).

La duración del EPA de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos con bacilos Gram negativos es relativamente corta. Craig & Gudmundsson en 1991, observaron que era necesaria una concentración de 10 veces la concentración mínima inhibitoria (CMI) de ampicilina para producir EPA en *H.influenzae*. De este modo concluyen que estos antibióticos sólo son capaces de producir EPA sobre bacilos Gram negativos a altas concentraciones.

### 1.3.5.DURACION DE LA EXPOSICION

El alargamiento del tiempo de exposición al antimicrobiano prolonga la duración del EPA ( Craig & Gudmundsson, 1991); (Vogelman & Craig, 1986); (Chin & Neu, 1987); (Bundtzen et al., 1981); (Eagle & Musselman, 1949); (Gerber & Craig, 1981); (Kuenzi et al., 1987); (Van der Auwera & Klastersky, 1987); (Mínguez y cols., 1990); (McDonald et al., 1976); (Shah et al., 1978).

Hay autores que llegan a equiparar el efecto que sobre el EPA tienen la duración de la exposición y la concentración de la droga; así por ejemplo el EPA resultante de doblar el tiempo de exposición, sería muy similar al que sigue al doblar la concentración de dicho antimicrobiano (Bundtzen et al., 1981); (Craig & Gudmundsson, 1991); (Pastor et al., 1994).

### 1.3.6.COMBINACIONES ANTIMICROBIANAS

El efecto que las combinaciones antimicrobianas tienen en la duración del EPA ha sido largamente analizada aunque la mayoría de los estudios se han focalizado en penicilinas,  $\beta$ -lactámicos, penemes o vancomicina en combinación con aminoglucósidos frente cocos Gram positivos, especialmente *Enterococcus faecalis* (Winstanley & Hastings, 1989 y 1990); (Hessen et al., 1989); (Fuursted, 1987, 1988 y 1989); (Dornbusch et al., 1989); (Bush et al., 1989); (Isaksson et al., 1991).

Se puede decir que, en general, estas combinaciones pueden tener un efecto aditivo, si el EPA producido por la asociación es similar a la suma de EPAs de cada droga individual; sinérgico, al menos una hora más prolongado que la suma de los EPAs de cada antibiótico individual o indiferente, cuando el EPA de un agente antimicrobiano no se ve ampliado por la asociación con otro; esto último se ha observado en enterococos con la asociación de

penicilina y un aminoglucósido al cual el microorganismo exhibía un alto nivel de resistencia (Winstanley & Hastings, 1989) así como también, en enterococos expuestos a asociaciones de ciprofloxacino con estreptomycin (Fuursted, 1988).

También ha sido estudiado el efecto de las combinaciones antimicrobianas en bacilos Gram negativos y pueden tener en términos de EPA un efecto sinérgico, como describieron Isaksson et al. en 1991 o Hanberger et al (1991), siendo el único caso en que se muestra un EPA sinérgico en combinaciones de dos antibióticos  $\beta$ -lactámicos (mecillinam y ampicilina, aztreonam, ceftazidima o piperacilina) frente a bacilos Gram negativos; aditivo, Hessen et al. en 1988; indiferente, Paglia et al. en 1989, Gudmundsson & Erlendsdottir (1988) y Craig & Gudmundsson (1991); o incluso antagónico, efecto detectado por Gould et al. (1989) en la combinación de ciprofloxacino con imipenem frente a cepas de bacilos Gram negativos.

Otro de los temas tratados es ver qué es lo que ocurre cuando un cultivo bacteriano es sometido a un agente antimicrobiano en la fase postantibiótica de otro. Algunos de estos estudios muestran que el EPA de un antibiótico puede ser prolongado cuando la bacteria, después de la eliminación del mismo, es reexpuesta a otra droga; en este sentido se expresa Fuursted (1989) con *E.faecalis* expuestos a antibióticos  $\beta$  lactámicos en combinación con 1/4 x CMI de estreptomycin.

Drabu & Blakemore (1991) llegan más lejos describiendo un efecto antagonista en la cepa Oxford de *S.aureus* cuando teicoplanina era añadida, a concentraciones suprainhítorias, en la fase de EPA de ácido fusídico y rifampicina. Este antagonismo no fue demostrado en otros aislados clínicos.

### 1.3.7. POST-EXPOSICION A CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS

Se ha demostrado tanto in vitro (Odenholt et al., 1989); (Oshida et al., 1990); (Winstanley et al., 1991); (Odenholt-Tornqvist et al., 1991 y 1992); (Cars & Odenholt, 1993) como in vivo (Täuber et al., 1984); (Odenholt et al., 1990) que el efecto postantibiótico de un antimicrobiano puede ser prolongado cuando la bacteria, después de la eliminación de la droga, es reexpuesta a concentraciones subinhibitorias de la misma.

Se baraja incluso la posibilidad de que cuando en algunos modelos la duración del EPA in vivo es mayor que in vitro sean debidos a esta causa y es que el EPA in vivo normalmente se mide a partir de cuando la concentración del antibiótico cae por debajo de su CMI, sin tener en consideración el posible efecto de las concentraciones subinhibitorias sobre el EPA de dicho fármaco (Ebert et al., 1988); (Sande et al., 1981).

### 1.3.8. TIPO DE MEDIO

La utilización de diferentes medios de cultivo para la determinación del EPA, han mostrado tener efectos variables sobre la duración del mismo. El más pronunciado ha sido observado con trimetoprim, el cual ofrece resultados muy dispares según sea añadido al caldo de tripticasa soja o al caldo de Mueller-Hinton así, pequeño o ningún EPA fue observado sobre *S.aureus* que crecían en caldo de tripticasa soja y era aproximadamente de dos horas cuando se utilizaba caldo de Mueller-Hinton como medio de cultivo. Estas diferencias se han visto como debidas al contenido de timidina del medio la cual inhibe la actividad del trimetoprim (Koch & Burchall, 1971).

Varios han sido los investigadores que han examinado el efecto sobre la duración del EPA de cationes  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  cuando se

agregan al caldo de Mueller-Hinton, que es el medio utilizado en la mayoría de los estudios in vitro, obteniendo resultados controvertidos según las combinaciones droga-microorganismo estudiadas ( Mínguez y cols. 1990; Gürdal et al. 1990; Gudmundsson et al. 1991 y Hanberger et al. 1991 ).

Otros iones metálicos multivalentes como el aluminio o hierro, pueden reducir la actividad antimicrobiana de las quinolonas, probablemente debido a la formación de complejos que son más difícilmente absorbidos por la bacteria (Smith & Lewin, 1988).

Suero, orina y líquido cefalorraquídeo, son otros de los medios donde se ha estudiado el efecto postantibiótico, comparándolos con el utilizado para estudios in vitro. Excepto en el trabajo de Bundtzen et al. (1981), los cuales demostraron que la amplitud del EPA en *E.coli* tras exposición a rifampicina y tetraciclina era significativamente reducida en suero humano, los demás estudios revisados apuntan lo contrario (Mínguez y cols, 1990); (Davidson et al., 1991).

Saverino et al. (1992) manifestaron que la presencia de suero incrementaba o disminuía la duración del EPA de fluritromicina, un nuevo macrólido, dependiendo de la cepa analizada ( *S.aureus*, *S.pyogenes*, *S.pneumoniae*, *H.influenzae* y *Moraxella catarrhalis* ).

Experimentos realizados con fluoroquinolonas frente a *E.coli* en orina humana, demuestran que ésta disminuye drásticamente el EPA (Zhanel et al., 1991), atribuyéndolo algunos autores (Chin & Neu, 1987 ; Blaser & Lüthy, 1988), a las altas concentraciones de cationes que hay en dicho fluido, así como a su bajo pH.

El líquido cefalorraquídeo por otra parte producía comparándolo con el caldo de Mueller-Hinton, un marcado

incremento del EPA de cefotaxima, ciprofloxacino y gentamicina frente a *E.coli*, sin afectación de la actividad bactericida. Estas observaciones realizadas por Zhanel et al. en 1992 fueron confirmadas un año más tarde por Karlowsky et al.

#### 1.3.9.PH

La mayoría de los estudios in vitro sobre variables farmacodinámicas, incluyendo el EPA, se realizan a pH 7,4.

En general, el pH ácido reduce la inhibición, actividad bactericida y EPA de los aminoglucósidos, quinolonas fluorinadas e imipenem ( Zhanel et al., 1991); (Mínguez y cols., 1990); (Craig & Gudmundsson, 1991); (Chin & Neu, 1987); (Espinoza et al., 1988); (Neu et al., 1989); (Sabath et al., 1970).

No se sabe claramente que es lo que induce tales diferencias, parece probable que sean debidas a cambios en la permeabilidad o en la unión de los agentes antimicrobianos a los receptores de la superficie o intracelulares de la bacteria como resultado de la variación del grado de ionización de la droga y de las estructuras celulares con diferentes  $pK_s$  (Newton & Kluza, 1978); (Sabath, 1982); (Thrupp, 1986), pudiendo ocasionarse un menor daño estructural a bajos pH, seguido de un rápido crecimiento de la bacteria (Gudmundsson A. et al, 1991).

#### 1.3.10.AGITACION MECANICA

Este parámetro ha sido poco estudiado. La mayoría de los investigadores realizan sus experimentos con cultivos en agitación.

Wilson & Rolinson (1979) no detectaron diferencias significativas entre los resultados obtenidos en agitación y aquellos en que el medio de cultivo se mantenía en reposo cuando estudiaron el EPA de penicilina G sobre *S.aureus*; a iguales conclusiones llegaron Mínguez y cols. en 1990 con ciprofloxacino frente a *S.aureus*, *E.coli* y *P.aeruginosa*. Sin embargo, Lee et al.(1982) observaron que la agitación mecánica acortaba la duración del EPA de ampicilina en *E.coli*.

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

#### 1.4.DETERMINACION DEL EPA "IN VITRO"

La determinación "in vitro" del EPA de un agente antimicrobiano sobre un cultivo bacteriano requiere varias fases:

- 1° Preparación del cultivo bacteriano.
- 2° Exposición al antimicrobiano.
- 3° Eliminación del antibiótico.
- 4° Seguimiento de la cinética de crecimiento del cultivo control ( no expuesto ) y tratados.
- 5° Cálculo del EPA.

De estos puntos analizaremos con detalle a lo largo de este trabajo los tres últimos, por ser los que ofrecen mayor variabilidad según los distintos autores que trabajan en EPA.

#### 1.4.1. ELIMINACION DEL ANTIMICROBIANO

Básicamente son cuatro los métodos rápidos de eliminación del antimicrobiano:

a) El método de lavados repetidos se basa en la centrifugación del caldo de cultivo a 1200 -2000 x g durante 5-10 minutos, seguido de la eliminación del sobrenadante y resuspensión del sedimento en caldo de cultivo sin antimicrobiano. Suelen realizarse al menos dos lavados para estar seguros de producir una reducción importante de la concentración del antibiótico.

b) Una técnica mucho más rápida de exclusión del antimicrobiano es la inactivación del mismo utilizando  $\beta$ -lactamasas, sin embargo tiene el problema de ser un procedimiento limitado a antibióticos  $\beta$ -lactámicos ( Odenholt et al. 1989 ).

También es factible para aminoglucósidos la adición de polvo de celulosa fosfato, el cual, se une e inactiva estos antimicrobianos, pero se necesita una posterior centrifugación para separar el complejo polvo-fármaco del microorganismo ( Gerber et al., 1982 ).

c) El método de dilución es quizás el más simple y fácil de realizar y muy utilizado por los investigadores (Bustamante et al., 1984); (Gerber & Craig, 1981); (Kuenzi et al., 1987); (Odenholt, Isaksson et al., 1989); (Rescott et al., 1988); (Van der Auwera & Klastersky, 1987); (Webster et al., 1988); (Zhanel et al., 1990). Se basa en la adición de un pequeño volumen del cultivo expuesto al antimicrobiano a un gran volumen de medio fresco libre de droga. Para concentraciones del antibiótico cercanas a su CMI, es suficiente una dilución  $10^{-2}$ . Si se utiliza concentraciones superiores a ésta, se requieren diluciones de  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$  (Bundtzen et al., 1981).

d) Algunos investigadores han utilizado el **método de filtración** para la eliminación del antibiótico (Baquero y cols., 1986); (Chin et al., 1988); (Neu et al., 1989), consiste en hacer pasar la solución bacteriana expuesta al antimicrobiano por filtros de membrana, de forma que la droga es eliminada y las bacterias quedan retenidas en el filtro, resuspendiéndose éstas posteriormente en caldo libre de antibiótico y realizando recuentos bacterianos.

Existen además una serie de métodos especiales o modelos farmacocinéticos que persiguen simular las condiciones "in vivo" de eliminación gradual del antimicrobiano conforme a una cinética de orden 1.

a) El **modelo de dilución** empleado por algunos autores (Bergan & Carlsen, 1980); (Della Bruna et al., 1989); (Gerber et al., 1982); (Grasso et al., 1978); (Murakawa et al., 1980); (Nishida et al., 1978); (Shah et al., 1988); (Stevenson et al., 1988), consiste en la eliminación del antimicrobiano por diluciones progresivas del caldo de cultivo que contiene el microorganismo y el fármaco, sustrayendo volúmenes iguales a los que se reponen con caldo libre de fármaco. El inconveniente de este modelo es que a la vez que diluimos el antimicrobiano hacemos otro tanto con la suspensión bacteriana. Algunos autores corrigen esto utilizando un filtro Millipore a la salida del frasco para reducir la pérdida de bacterias (Shah, 1981); (Della Bruna et al., 1989).

b) El **modelo de diálisis** consiste en un sistema cerrado que contiene el organismo estudiado, separado por una membrana semipermeable del sistema que proporciona medio fresco. Se puede simular los patrones de absorción intravenosa e intramuscular, dependiendo de si se añade directamente el antimicrobiano al sistema cerrado conteniendo el microorganismo o al sistema que proporciona el medio fresco. Tienen la ventaja sobre el modelo

anteriormente descrito de que no diluye los microorganismos. Esta técnica ha sido usada por varios autores (Elaser et al., 1985); (Toothaker et al., 1982); (Zinner et al., 1981).

Un problema importante que se presenta con ambos modelos farmacocinéticos es extraer del EPA el efecto debido a concentraciones subinhibitorias del antimicrobiano, así como tampoco ha sido definida la metodología para cuantificar el EPA en estos modelos (Craig & Gudmundsson, 1991).

#### 1.4.2. SEGUIMIENTO DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO

##### 1.4.2.1. RECIENTOS VIABLES

Realiza el seguimiento de la cinética de crecimiento del cultivo control y del tratado con antibiótico, a través de múltiples recuentos viables en placa (Parker & Luse, 1948); (McDonald et al., 1977); (Bundtzen et al., 1981); (Craig & Gudmundsson, 1986 y 1991); (Howard et al., 1993).

El cálculo del EPA se efectúa según la ecuación  $EPA = T - C$ ; donde T, es el tiempo requerido para que el recuento de colonias (UFC/ml) del cultivo expuesto (una vez eliminado el antibiótico) se incremente diez veces y C, el tiempo necesitado por el cultivo control (no expuesto) para hacer lo mismo ( después de completarse el mismo procedimiento de eliminación de la droga ).

La razón por la que se elige arbitrariamente un incremento de diez veces, es porque más allá de este nivel la velocidad de crecimiento de los organismos expuestos al antibiótico es la misma que la de los controles no tratados (McDonald et al., 1977), así pues lo que realmente se mide es el tiempo que tarda

el cultivo expuesto en volver a alcanzar el crecimiento logarítmico normal (Craig & Gudmundsson, 1986).

El ejemplo teórico que muestra la Figura 5 representa el crecimiento bacteriano de un cultivo control y el mismo cultivo tratado con antibiótico, tras completar el proceso de eliminación del antimicrobiano. Cuando el cultivo tratado alcanza su crecimiento logarítmico normal, porque ha superado el efecto postantibiótico, su curva de crecimiento es igual (paralela) a la curva de crecimiento del cultivo control; en esta situación daría lo mismo tomar para definir el EPA un incremento en las UFC/ml de 10 veces, 100 veces ó 1000 veces.

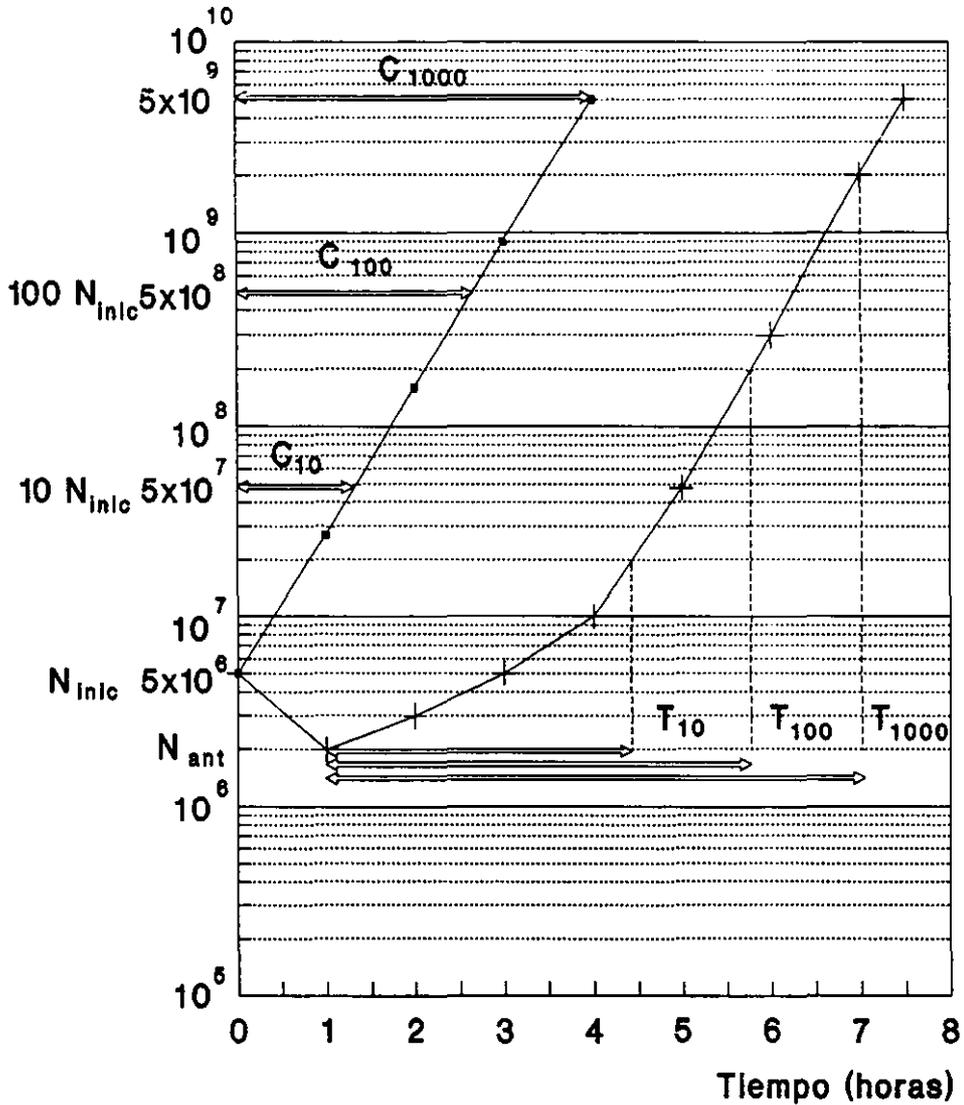


Figura 5.- Curva teórica de crecimiento de un cultivo bacteriano control y otro expuesto al antibiótico tras la eliminación del mismo

$$EPA = T_{10} - C_{10}$$

$$EPA = T_{100} - C_{100}$$

$$EPA = T_{1000} - C_{1000}$$

#### 1.4.2.2. ESPECTROFOTOMETRIA

La estimación de la densidad de una suspensión bacteriana midiendo su opacidad con un aparato fotoeléctrico comenzó en los años 30 (Longsworth, 1936); (Monod, 1949). Con la actual disponibilidad de fotómetros y espectrofotómetros esta práctica es ahora el procedimiento comunmente usado para medir el crecimiento bacteriano de cultivos puros (Mattie, 1981); (Koch, 1981).

La espectrofotometría consiste en medir la intensidad del rayo primario de luz que alcanza el fotodetector una vez que pasa a través de la muestra sin desviarse de su trayectoria original, en relación con el rayo que llega cuando se utiliza el medio sin inocular y que sirve como "blanco".

Aparte de la limitación de sensibilidad del método, otro de los problemas que nos podemos encontrar es cuando existe un cambio de la morfología bacteriana como ocurre por ejemplo con los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, los cuales provocan formación de filamentos en las bacterias Gram negativas pudiendo producir un aparente aumento de la concentración bacteriana medida espectrofotométricamente (Kavanagh, 1963).

#### 1.4.2.3. NEFELOMETRIA

Cuando se mide directamente en un fotodetector la cantidad de luz que es desviada de su trayectoria original una vez que traspasa la muestra, estamos utilizando una técnica denominada Nefelometría.

Los nefelómetros son en general más sensibles que los espectrofotómetros a la hora de detectar cambios de densidad

bacteriana a niveles bajos ( entre  $10^4$  y  $10^6$  UFC/ml ) (Malette M.F., 1969).

Usando un nefelómetro con ángulos variables ( desde  $5^\circ$  hasta  $30^\circ$  ), Koch & Ehrenfeld (1968) encontraron una relación directamente proporcional entre densidad celular e intensidad de luz desviada.

Los nefelómetros no han sido usados de forma rutinaria para determinar la población microbiana así como tampoco para el estudio del EPA, quizá debido, a las variaciones de sensibilidad del método con el tamaño celular y las características del medio de cultivo ( Carlberg D.M., 1986 ).

#### 1.4.2.4. BIOLUMINISCENCIA

La cuantificación del ATP bacteriano por bioluminiscencia es una técnica directa, rápida y sensible de medición de la biomasa bacteriana (D'Eustachio & Johnson, 1968); (Isaksson et al., 1988). Con ella el número de bacterias es calculado según el contenido de ATP intracelular de la muestra, asumiendo que dicho contenido es relativamente constante (Isaksson et al., 1988). La detección del ATP se produce a niveles de  $10^{-10}$  M el cual corresponde aproximadamente a  $10^4$  UFC/ml ( Molin et al., 1983 ).

La técnica de bioluminiscencia realizada por la mayoría de los autores (Hanberger et al., 1990); (Winstanley & Hastings, 1989 y 1990); (Hanberger, Nilsson L.E., Nilsson M. & Maller, 1991); (Hanberger, Nilsson, Svensson & Maller, 1991); (Odenholt et al., 1989); (Odenholt-Tornqvist, 1989); (Isaksson et al., 1988 ; 1991 ; 1993) consiste básicamente en eliminar primero el ATP extracelular mediante la incubación de la muestra con una solución de apirasa y posterior rotura de las células bacterianas

causando la salida de su contenido de ATP el cual es medido. Posteriormente se añade a cada extracto la luciferasa y la intensidad de luz emitida es medida en un Luminómetro. Los niveles de ATP de la muestra son calculados utilizando ensayos con cantidades estándares de ATP que sirven como referencia. Cada experimento incluye al menos un cultivo control, no expuesto, el cual es sometido al mismo proceso que los tratados. El crecimiento de la bacteria es monitorizado cada hora por la técnica de bioluminiscencia del ATP bacteriano, determinando la viabilidad bacteriana, como UFC/ml, por diluciones seriadas en placa antes y después de la exposición al antimicrobiano.

#### 1.4.2.5. ADAPTACION DEL SISTEMA BACTEC

El sistema de hemocultivos BACTEC NR 730 detecta el CO<sub>2</sub> bacteriano por espectroscopía infrarroja del gas aspirado de la parte superior del vial de hemocultivo. La medida del CO<sub>2</sub> absorbido por el espectrofotómetro se expresa en términos de valores de crecimiento, en general se recomienda el subcultivo del vial de hemocultivo cuando éste alcanza un valor de crecimiento (VC) de 30 que corresponde a 10<sup>6</sup>-10<sup>8</sup> UFC/ml, dependiendo de la especie bacteriana y del pH, oxigenación y temperatura del medio.

#### 1.4.2.6. METODOS RADIOMETRICOS

La tasa de incorporación de <sup>3</sup>H-timidina por la bacteria, ha sido usada en el seguimiento de la cinética de crecimiento del cultivo bacteriano tras la exposición al antibiótico y en la cuantificación del EPA por Gottfredsson et al. (1989).

La ventaja de este método respecto al de bioluminiscencia y espectrofotometría, es que la bacteria muerta, pero no lisada,

no incorpora  $^3\text{H}$ -timidina y sin embargo, puede contener ATP intracelular y contribuir a la densidad óptica.

#### 1.4.2.7. ENUMERACION MICROSCOPICA

La enumeración microscópica es una técnica barata de recuento directo de células bacterianas. Tiene como ventajas el que el equipo necesario para su aplicación está disponible en cualquier laboratorio de bacteriología y que proporciona información adicional sobre el tamaño y la morfología de las células bacterianas contadas. El mayor inconveniente de este sistema es lo tedioso que resulta ( Koch, 1981 ).

#### 1.4.2.8. CONTAJE ELECTRICO

La resistencia eléctrica se basa en el principio de modificación de la densidad del flujo de corriente por las células suspendidas en el medio. Las células bacterianas son malas conductoras de la corriente eléctrica, si una de estas células se interpone en la trayectoria de una corriente eléctrica, le presentan una resistencia que conlleva una caída del voltaje, este descenso del voltaje puede ser medido con un instrumento apropiado. Coulter Electronics, Inc., promovieron la utilización de este principio en el recuento de poblaciones bacterianas u otras células.

#### 1.4.2.9. IMPEDANCIA ELECTRICA

La fuerza que se opone al paso de la corriente eléctrica se conoce como resistencia; la relación entre resistencia, corriente y voltaje la establece la ley de Ohm ( generalmente aplicada a corrientes continuas) pero, si hacemos pasar una corriente

alterna a través de un conductor, otras fuerzas aparte de la simple resistencia entran en juego, la suma de estas fuerzas se denomina impedancia (Carlberg, 1986).

En 1975 Goldschmidt y Wheeler, mostraron que una concentración de células bacterianas tan baja como es  $10^3$  /ml, podía ser detectada midiendo la impedancia de esta suspensión en agua. Para ello dos electrodos, entre los que se hacía pasar una corriente alterna, eran emplazados en la suspensión y otros dos electrodos, que eran dispuestos entre los anteriores, eran conectados a un osciloscopio de forma que, cualquier cambio en la impedancia de la suspensión, se reflejaba en un cambio en el voltaje entre estos electrodos internos y era medido. La caída de la impedancia no era detectable hasta que la población bacteriana alcanzaba un cierto nivel conocido como umbral de la población, en la práctica este umbral es cercano a  $10^6$ - $10^7$  células/ml (Gall & Curby, 1980).

### 1.5.DETERMINACION DEL EPA "IN VIVO"

Los conocimientos del EPA "in vivo" se basan en muestreos seriados de un tejido o fluido biológico de un animal y la determinación de bacterias viables tras el tratamiento antimicrobiano y descenso de los niveles del fármaco en dichos lugares.

Independientemente del modelo de infección animal elegido para el estudio del EPA "in vivo", la metodología de trabajo es básicamente la misma, constando de los siguientes pasos:

1° Varios días antes del ensayo se inyecta un inmunosupresor a los animales que se quieran hacer neutropénicos. Si se van a utilizar animales con sus defensas conservadas se obvia este paso.

2° Se prepara un cultivo en fase logarítmica de crecimiento del microorganismo a estudiar y se inocula en el animal.

3° Se inyecta el antibiótico a los animales seleccionados. A este momento se le llama Tiempo 0. Normalmente se intenta administrar una dosis de antibiótico que obtenga concentraciones en suero superiores a la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) de 1 a 2 horas. Estos niveles se determinan extrayendo muestras de suero a los animales tratados.

4° Tras la administración del antibiótico, se sacrifican a diferentes tiempos los animales tratados; también se matan otros que no han recibido el agente antimicrobiano y que se utilizan como controles.

5° Se siembran las placas de agar con el homogeneizado de tejido o el líquido extraído del animal. Se incuban las placas.

6° Finalmente se realizan los recuentos de las UFC/ml.

Varios modelos han sido puestos a punto para el estudio del EPA "in vivo": El modelo de infección de muslo de ratones neutropénicos, utilizado por Gudmundsson et al. (1986); Vogelmann et al. (1988) y Craig & Gudmundsson (1991) presenta varias ventajas. En primer lugar, permite cuantificar con facilidad el número de bacterias en el lugar de la infección mediante homogeneización del muslo. En segundo lugar, la concentración del fármaco en el intersticio del músculo es muy similar a la del suero. En tercer lugar, la rápida vida media de la mayoría de los antimicrobianos en los ratones permite obtener tiempos de exposición cortos y, por último, resulta sencillo provocar neutropenia en el ratón, lo que permite estudiar la acción del antibiótico frente a los microorganismos sin interferencia de ninguno de los principales sistemas de defensa del huésped (Craig et al., 1988).

El modelo de meningitis en conejos, usado por Sande et al. (1981) y Täuber et al. (1984), tiene algunas ventajas como que la concentración de la droga puede ser medida directamente en el

sitio de la infección y que los estudios del EPA in vivo pueden ser determinados en cada animal por separado (Craig & Gudmundsson, 1991).

El modelo de implantes subcutáneos de "jaulas de tejidos" en conejos con sus mecanismos de defensa conservados utilizado por Odenholt et al. en 1988 y 1990, tiene algunas ventajas como que las repetidas tomas de muestra para evaluar la cinética de crecimiento bacteriano son fáciles de realizar percutáneamente, la concentración del antibiótico puede ser evaluada tanto en el sitio de infección como en el suero, la interacción de concentraciones subinhibitorias de la droga puede ser evitada, las variaciones interindividuales son eliminadas ya que el animal expuesto es su propio control y los experimentos pueden realizarse en animales con sus mecanismos de defensa intactos.

El modelo de endocarditis en ratas, utilizado por Hessen et al. en 1989 e Ingerman et al. en 1986, es apropiado para demostrar los efectos farmacocinéticos de los antibióticos ya que la vegetación está en un sitio recluído, donde aparentemente los mecanismos de defensa del huésped tienen poca importancia en la eliminación de la bacteria, por tanto, el aclaramiento de los microorganismos es principalmente debido a la tasa y extensión del efecto bactericida de la terapia antimicrobiana y a la duración del EPA (Hessen et al., 1988 y 1989).

Renneberg & Walder en 1988 y 89, desarrollaron un modelo que usa fibras de algodón infectadas que implantan subcutáneamente, a través de una pequeña incisión, en el lomo de un ratón normal. Las fibras son eliminadas antes y después de la exposición a la droga. Este modelo tiene la potencial ventaja sobre el de infección de muslo de ratón, en que permite simultáneos ensayos del número bacteriano y de la concentración del antibiótico en el sitio de infección, así mismo, estos investigadores apuntan que la farmacocinética de los antimicrobianos en el líquido de

la fibra subcutánea es muy similar a la del suero con una ligera fase de retraso (Renneberg & Walder, 1988).

El EPA es calculado siguiendo la fórmula (Craig & Gudmundsson, 1991):  $EPA = T - C - M$ , donde M, representa el tiempo que los niveles de la droga en suero exceden su CMI; T, es el tiempo requerido para que los recuentos de UFC del animal tratado se incrementen 10 veces a partir del recuento a tiempo M (o sea cuando la concentración de antibiótico cae por debajo de la CMI) y C, el tiempo necesario para que los contajes de UFC del animal control no tratado se incrementen en 10 veces por encima del recuento a Tiempo 0 ( cuando se inyecta el antibiótico al animal ).

## 1.6. SIGNIFICADO BIOLÓGICO DEL EPA

### 1.6.1. AUMENTO DE LA SUSCEPTIBILIDAD BACTERIANA A LOS LEUCOCITOS EN FASE POSTANTIBIÓTICA

Hay algunos trabajos que pueden explicar por qué la actividad in vitro de un agente antimicrobiano no refleja exactamente la respuesta terapéutica en animales y en humanos (Barza, 1978); (Zak et al., 1985). El efecto antibacteriano in vivo no se restringe al daño directo de la bacteria por la droga, sino que también depende de uno o varios de los componentes del sistema inmune como polimorfonucleares, lisozima y complemento. La bacteria expuesta al antibiótico, incluso a concentraciones subinhibitorias, puede cambiar su estructura celular superficial dando lugar a modificaciones de los antígenos de superficie, hidrofobicidad y excreción de enzimas y toxinas. Algunos de estos organismos se hacen así más susceptibles al ataque fagocitario (Lorian & Atkinson, 1978); (Forsgren, 1984); (Pruul et al., 1986); (Bayer et al., 1991).

McDonald et al. en 1981 ; Pruul et al. en 1981, 88 y 90; Fantin et al en 1990 y Novelli et al. en 1992 demostraron que los organismos en la fase postantibiótica son más susceptibles a la actividad antibacteriana de los leucocitos humanos. A este fenómeno se le ha denominado PALE ( Postantibiotic Leukocyte Enhancement ).

McDonald et al. (1981) y Pruul & McDonald (1990), explican este fenómeno considerando que el antibiótico sensibiliza a la bacteria a los mecanismos de muerte intraleucocitarios. Esta hipótesis fue confirmada observando como la fenilbutazona, la cual reduce la fagocitosis de los polimorfonucleares (PMN) humanos en un 40% suprimiendo también la muerte intracelular en estas células (Solberg et al., 1978), fue capaz de inhibir la actividad leucocitaria frente a *E.coli* sensibilizada por un antibiótico (Pruul et al., 1981).

Van der Auwera apunta, en 1988, que la destrucción intracelular en los PMN puede no ser el único fenómeno que resulte favorecido, sino que también puede aumentar significativamente la destrucción extracelular. Las bacterias tratadas pueden no resultar lesionadas de forma irreversible por la acción del fármaco, pero quedan muy sensibles a los aniones superóxido, a otros radicales tóxicos, a los productos microbicidas y a las enzimas liberadas durante la desgranulación de los PMN en el proceso de fagocitosis.

En la práctica "in vivo" el fenómeno PALE ha sido puesto de manifiesto por Gerber & Craig en 1981; Roosendaal et al. (1985, 1986); Gerber et al. (1985 y 1986) y Raponi et al. en 1988, 1989 y 1990.

### 1.6.2. DISMINUCION DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA EN LA FASE POSTANTIBIOTICA

Si bien los datos referentes a este tema son limitados, parece ser que los microorganismos durante la fase de EPA pueden mostrar una sensibilidad disminuída a la actividad bactericida de ciertos antimicrobianos (Gerber & Craig, 1981); (Vogelman et al., 1983).

Odenholt et al. (1990) demostraron in vivo, utilizando el modelo de implantes subcutáneos de "jaulas de tejido" en conejos, que cuando un cultivo de *S.pyogenes* era reexpuesto a concentraciones suprainhedoras de penicilina durante la fase de EPA inducido por esa misma droga en este germen, el efecto bactericida era el mismo que el que ocurría cuando la bacteria era expuesta sólo a la primera dosis de antibiótico. Estos resultados corroboran los observados un año antes por estos mismos autores estudiando el EPA in vitro (Odenholt et al., 1989).

También Craig & Gudmundsson en 1991 describieron una disminución de la actividad bactericida de ampicilina sobre *S.pneumoniae* durante la fase postantibiótica inducida en este organismo por eritromicina.

Por último, Meng et al. (1992) indicaron la pérdida de la actividad bactericida de algunas quinolonas como norfloxacino, ciprofloxacino y perfloxacino durante el EPA inducido por rifampicina en *E.coli*.

## OBJETIVOS DEL ESTUDIO

## 2.-OBJETIVOS DEL ESTUDIO

1.-Puesta a punto de un nuevo método espectrofotométrico de determinación del efecto postantibiótico (EPA).

2.-Validación de dicha técnica por comparación con el método clásico de recuentos viables en agar.

3.-Estudio del EPA de un aminoglucósido (gentamicina), tres antibióticos  $\beta$ -lactámicos (piperacilina , ceftriaxona e imipenem) y una quinolona (ciprofloxacino) sobre las cepas patrones: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

4.-Determinación del EPA de estos mismos antimicrobianos en aislados clínicos de hemocultivos, utilizando éste método espectrofotométrico.

5.-Valoración de la influencia de la concentración del agente antimicrobiano en la duración del EPA.

6.-Evaluación de las alteraciones morfológicas que imprimen los antibióticos  $\beta$ -lactámicos sobre los bacilos Gram negativos estudiados y su repercusión sobre la duración del EPA.

## MATERIAL Y METODOS

### 3.1.MATERIAL

#### 3.1.1.CEPAS BACTERIANAS

Para la realización de este estudio utilizamos tres cepas patrones: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, obtenidas del American Type Culture Collection.

También empleamos 6 aislados clínicos de hemocultivos conservados a -80°C en un estabilizador compuesto de glicerina, caldo brucella y suero de caballo estéril. Estas cepas habían sido identificadas por especie y número de congelación como *E.coli* 347 y 304; *P.aeruginosa* 276 y 351; *S.aureus* 356 y 360.

Una vez descongeladas, se realizaban pases en agar sangre cada 48 horas para mantener el cultivo.

#### 3.1.2.AGENTES ANTIMICROBIANOS

Los antibióticos usados fueron: Gentamicina ( Schering-Plough ); Ciprofloxacino ( Bayer ); Piperacilina ( Lederle ); Ceftriaxona ( Roche ) e Imipenem ( Merck Sharp and Dohme ).

Estos agentes antimicrobianos fueron suministrados por los laboratorios en forma de polvo valorado con una potencia de 63% (gentamicina); 82,7% (ciprofloxacino); 94,5% (piperacilina); 84% (ceftriaxona); 100% (imipenem).

Preparamos soluciones madres a concentraciones de 1000 µg/ml. Para ello seguimos la fórmula abajo indicada que nos permite calcular qué cantidad de antibiótico ( con la potencia que señala el fabricante ) ha de pesarse para que al mezclarse con el diluyente se obtenga un volumen determinado de solución madre deseada:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volumen (ml)} \times \text{Concentración (mcg/ml)}}{\text{Potencia del antibiótico (\%)}}$$

Ej. Si queremos preparar 100 ml de una solución madre de gentamicina a una concentración de 1000 µg/ml teniendo en cuenta que la potencia del antibiótico suministrado por el fabricante es de 63%

$$\text{Peso} = \frac{100 \text{ ml} \times 1000 \text{ mcg/ml}}{63\%} = \frac{100000 \text{ mcg/ml}}{1,587} = 63.012 \text{ mcg} = 63 \text{ mg}$$

En todos los casos utilizamos como diluyente agua destilada estéril, excepto con imipenem, en el que empleamos buffer fosfato 10 mM pH: 7,2.

Estas soluciones madres se almacenaban, en volúmenes de 1 ml, a -40°C y -80°C (imipenem) hasta su utilización.

### 3.1.3. MEDIOS

#### 3.1.3.1. MEDIOS DE CULTIVO

Para el seguimiento de la cinética de crecimiento del microorganismo por espectrofotometría, utilizamos caldo Mueller-Hinton (Difco). Para los recuentos viables en agar, agar Mueller-Hinton (Oxoid).

Estos mismos medios han sido empleados para el cálculo de la CMI por dilución en caldo y dilución en agar respectivamente.

Para preparar el caldo se suspende 21 gramos de medio en 1 litro de agua destilada, se calienta al baño maría hasta que se disuelva completamente, se esteriliza mediante filtros MILLIPORE Sterivex de  $0,45 \mu\text{m}$  (Millipore Products Division) y se dispensan en botes de vidrio estériles de 100 ml con tapón de rosca. El pH final a  $25^{\circ}\text{C}$  es de  $7,3 \pm 0,1$ .

El objeto de esterilizar el medio por filtración, es el de soslayar los cambios de coloración y turbidez del caldo a consecuencia del autoclavado.

El contenido de cationes divalentes por litro de este preparado era de 8,75 mg de  $\text{Ca}^{++}$  y 5,15 mg de  $\text{Mg}^{++}$ .

Este medio se prepara el día antes de la realización de cada prueba, conservándose durante toda la noche a  $35^{\circ}\text{C}$  en la cámara caliente, todo ello nos permite detectar posibles contaminaciones y disponer de frascos precalentados.

Para el agar se añade 38 gramos de medio a 1 litro de agua destilada, se calienta y agita hasta ebullición el tiempo necesario para que el preparado se disuelva completamente. Se dispensa en un matraz y se esteriliza en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Se saca y se deja enfriar hasta que alcanza una temperatura de  $50-55^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se reparte en las placas. El pH final es de  $7,4 \pm 0,2$ .

#### 3.1.3.2.MEDIO DE DILUCION PARA RECuentOS VIABLES

Hemos utilizado solución salina estéril al 9‰, la cual preparamos mezclando 9 gramos de cloruro de sodio (Merck) con 1000 ml de agua destilada. La esterilización se realiza en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Posteriormente se dispensa en tubos en volúmenes de 4,5 y 5 ml y se conserva, hasta que vaya a ser utilizada, a  $4^{\circ}\text{C}$  en la cámara fría.

#### 3.1.4.EQUIPO DE MEDICION

El aparato medidor por espectrofotometría que utilizamos es un SPECTRONIC<sup>®</sup> 20 ( Milton Roy Company ). Trabajamos con una longitud de onda de 450 nm y con tubos de espectrofotómetro de 19 mm de diámetro ( Perkin-Elmer ).

#### 3.1.5.INCUBADOR-AGITADOR

Durante la realización de cada experiencia, los tubos con los cultivos bacterianos eran incubados a 37°C en agitación, 50 agitaciones/min, en un sistema incubador-agitador, UNITRONIC 320 OR ( P-SELECTA ).

#### 3.1.6.EQUIPO DE CONTAJE DE COLONIAS

Darkfield QUEBEC<sup>®</sup> colony counter, modelo 3326 (American optical corporation), es el aparato que utilizamos para realizar los recuentos viables en placa.

#### 3.1.7.COLORANTES

Para observar el material nuclear utilizamos dos tinciones: Giemsa y Naranja de Acridina.

El colorante de Giemsa se encuentra comercializado por Merck como solución madre concentrada. Con esta tinción aparece marcado el núcleo de la bacteria con un color azul-violeta intenso.

Para preparar la solución madre de Naranja de Acridina, seguimos el método de Mc Carthy & Senne ( 1980 ). Este colorante tiene una marcada afinidad por los ácidos nucleicos, ya sea en

su forma nativa o desnaturalizada (Finegold & Baron, 1989). Los componentes ARN toman una coloración naranja-rojiza y el ADN amarillo-verde (Duguid, 1989).

La tinción de Giemsa fue empleada para teñir las extensiones de los cultivos de *E.coli*, tras haber sido expuestos a ceftriaxona, piperacilina e imipenem, así como los de *P.aeruginosa*, cuando eran tratados con este último agente.

La tinción de Naranja de Acridina fue usada para teñir las extensiones de los cultivos de *P.aeruginosa* que habían sido expuestos a ceftriaxona, debido a que en estos casos no era buena la visualización del material nuclear con la coloración de Giemsa.

### 3.2.METODOS

#### 3.2.1.DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI)

##### 3.2.1.1.CMI POR DILUCION EN CALDO

Se realizaron diluciones seriadas en base dos del antibiótico a estudiar en caldo de Mueller-Hinton. El rango de concentraciones prefijado fue desde 4  $\mu\text{g/ml}$  hasta 0,03  $\mu\text{g/ml}$  para gentamicina; 32  $\mu\text{g/ml}$  hasta 0,015  $\mu\text{g/ml}$  para ceftriaxona; 8  $\mu\text{g/ml}$  hasta 0,5  $\mu\text{g/ml}$  para piperacilina; 1  $\mu\text{g/ml}$  hasta 0,003  $\mu\text{g/ml}$  para ciprofloxacino y desde 8  $\mu\text{g/ml}$  hasta 0,003  $\mu\text{g/ml}$  para imipenem.

Cada dilución antibiótica se puso en contacto con un inóculo aproximado de  $5 \times 10^5$  UFC/ml de la suspensión bacteriana durante 18-20 horas a 35°C.

En cada experimento se incluyó un control negativo y otro positivo ( a partir del cual se evidenció el tamaño del inóculo expuesto ).

Tras la incubación, se procedió a la lectura e interpretación de los resultados para ello, se definió la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) como la más baja concentración de antimicrobiano que visualmente es capaz de inhibir completamente el crecimiento bacteriano, siempre tomando como referencia el control negativo, en el que no se detecta crecimiento.

##### 3.2.1.2.CMI POR DILUCION EN AGAR

Se siguieron las recomendaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) de 1990.

Se realizaron diluciones seriadas en base dos de cada antibiótico en agua destilada o buffer fosfato 10 mM pH 7,2 en el caso de imipenem para obtener, mezclando 1 ml de cada dilución con 19 ml de agar Mueller-Hinton a 50°C, el rango de concentraciones finales indicado anteriormente en la dilución en caldo.

Se ajustó la densidad de los cultivos bacterianos para obtener una turbidez equivalente al 0,5 del estandar de Mc Farland, la cual contiene aproximadamente  $10^8$  UFC/ml. Estas suspensiones ajustadas se diluyeron posteriormente 1/10 en solución salina para conseguir una concentración de  $10^7$  UFC/ml.

La inoculación se realizó por medio del aparato replicador descrito por Steers et al. en 1959.

La aguja del replicador coge aproximadamente 1-2  $\mu$ l y lo deposita sobre la superficie del agar, así pues, el inóculo es aproximadamente  $10^4$  UFC.

Se efectuó un control del inóculo realizando una dilución  $10^{-3}$  de la suspensión bacteriana y tomando 100  $\mu$ l que se depositaron en una placa de agar Mueller-Hinton y se extiendieron con un asa estéril.

Las placas se incubaron en la cámara caliente a 35°C durante 18-20 horas.

Posteriormente se procedió a la lectura e interpretación de los resultados. La CMI corresponde a la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir completamente el crecimiento bacteriano, sin considerar una sóla colonia o un débil sombreado causado en el agar por el inóculo.

### 3.2.2.DETERMINACION DE LA CINETICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO

#### 3.2.2.1. CINETICA DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

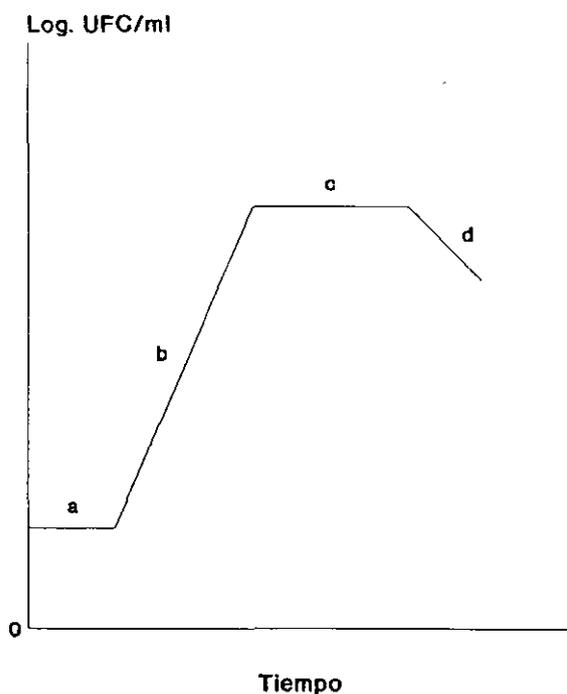
En un cultivo bacteriano, los organismos crecen y cuando alcanzan un tamaño crítico se dividen en dos células hijas iguales. Estas divisiones se hacen asincrónicamente entre los miembros de una población ( Gareth ,1990 ).

Cuando un cultivo bacteriano se introduce en caldo fresco los microorganismos no comienzan inmediatamente a crecer, sino que experimentan una fase de retraso que no es más que la adaptación de los mismos a su nuevo ambiente ; esta fase se caracteriza por una intensa actividad metabólica y su duración varía considerablemente dependiendo de la composición del medio y del propio microorganismo , incluso cuando las células son transferidas desde un cultivo en crecimiento exponencial a un medio idéntico nuevo, puede producirse un ligero retraso especialmente en un medio mínimo y con inóculos bajos ( Davis et al., 1984 ). El retraso afecta más al número de células que a su masa, ya que las células están metabolizando y por tanto aumentan en tamaño pero no en número ( Gareth, 1990 ). A esta fase le sigue la de crecimiento exponencial durante la cual la velocidad de crecimiento del germen es constante siguiendo la relación:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x$$

que significa que el incremento en el número de células viables (dx) en un intervalo de tiempo (dt) es igual a la tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ) que en este periodo es constante y a la concentración de células (x) de ese cultivo ( Gareth, 1990 ). A este periodo se le suele llamar también fase logarítmica porque el logaritmo de la masa bacteriana aumenta de forma lineal con

el tiempo ( Meynell & Meynell, 1970 ). Posteriormente, como resultado de los cambios físico-químicos que se producen en el medio de cultivo como consecuencia del crecimiento bacteriano y de la escasez de nutrientes, las bacterias alcanzan una fase estacionaria de crecimiento en la cual presentan cambios químicos de tipo adaptativo que aumentan su estabilidad pero si la incubación continúa, como las fuentes energéticas son limitadas se produce la muerte celular y las consiguientes alteraciones de membrana activan las enzimas autolíticas. Los productos liberados por los procesos de autólisis mantienen un crecimiento críptico de unas pocas células supervivientes ( por ej. supervivencia sin crecimiento neto) de ahí que los mutantes más resistentes se acumulen a pesar de que no exista un verdadero crecimiento ( Davis et al., 1984 ) ( Figura 6 ).



**Figura 6.-** Fases del crecimiento bacteriano;  
a: fase de retraso; b: fase de crecimiento logarítmico; c: fase estacionaria; d: fase de muerte.

Durante el crecimiento logarítmico se verifica que al cabo de cierto tiempo ( tiempo de generación -  $t_g$  - ) cada bacteria se divide;  $t_g$  es constante para cada especie bacteriana en unas condiciones definidas de cultivo ( medio, pH, temperatura etc.).

Si en un tiempo inicial  $t_{inic}$  tenemos  $N_{inic}$  de bacterias al cabo de  $n$  generaciones tendremos  $N_n$  bacterias

$$N_n = N_{inic} 2^n \quad (2)$$

Al cabo de un tiempo  $t$  se habrán sucedido  $t/t_g = n$  generaciones de forma que el número de bacterias al cabo de un tiempo  $t$  será:

$$N_t = N_{inic} 2^{t/t_g} \quad (3)$$

Tomando logaritmos:

(4)

$$\log N_t = \log N_{inic} + t \frac{\log 2}{t_g}$$

"  $t_g$  " es constante para unas condiciones experimentales dadas, entonces:

(5)

$$K = \frac{\log 2}{t_g}$$

$$\log N_t = \log N_{inic} + Kt \quad (6)$$

Por lo que la representación del  $\log N_t$  en ordenadas frente al tiempo (  $t$  ) en abscisas da una línea recta que corta al eje de abscisas en  $\log N_{inicial}$  ( Figura 7 ).

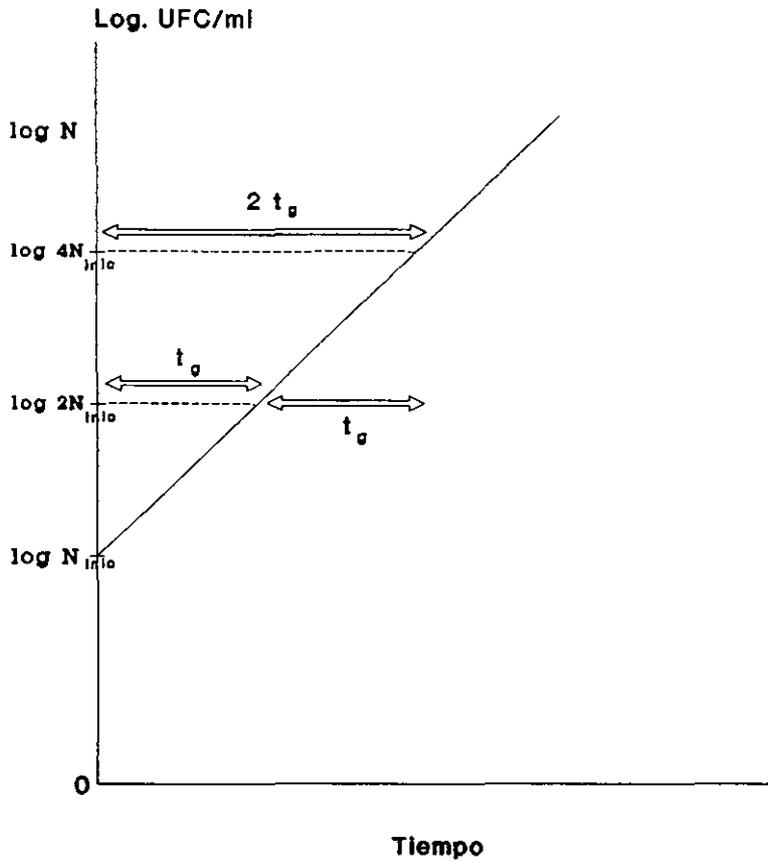


Figura 7.- Representación gráfica del aumento de la población bacteriana en el tiempo

Esta gráfica recta puede construirse utilizando en ordenadas los valores de  $N$  ( Figura 8 ) o bien el log de  $N$  ( Figura 9 ).

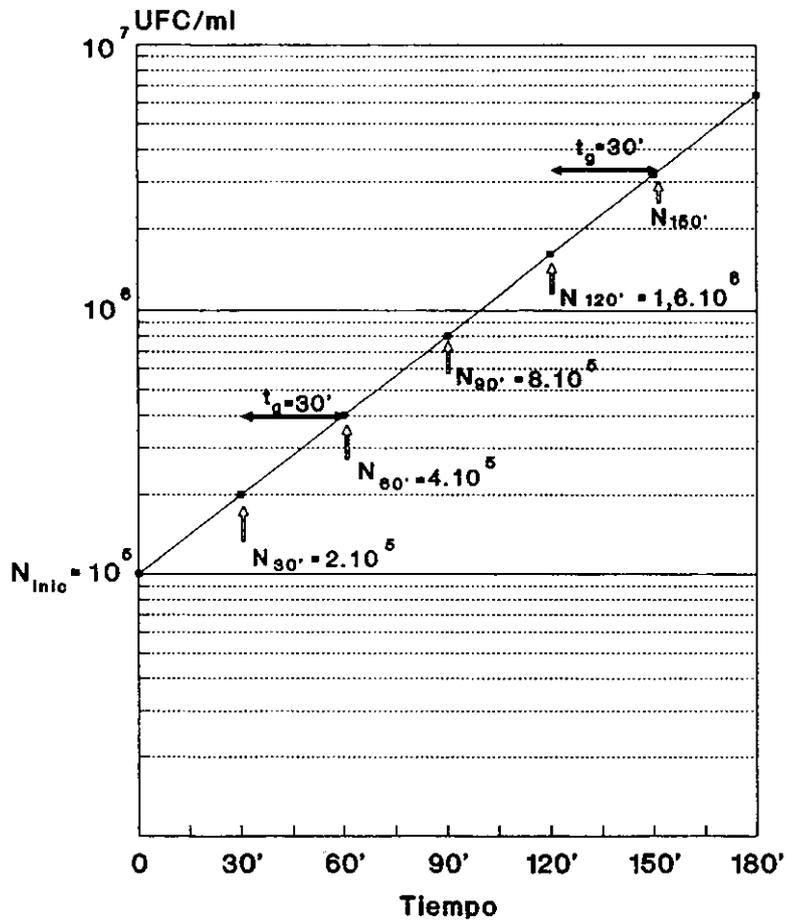


Figura 8.- Representación teórica semilogarítmica del crecimiento bacteriano logarítmico de una bacteria con tiempo de generación 30'y Ninic = 10E5 UFC/ml

$$\begin{aligned}
 N_{inic} &= 10^5 \dots\dots\dots \log N_{inic} = 5 \\
 N_{30'} &= 2 \cdot 10^5 \dots\dots\dots \log N_{30'} = 5,3 \\
 N_{60'} &= 2^2 \cdot 10^5 = 4 \cdot 10^5 \dots\dots\dots \log N_{60'} = 5,6 \\
 N_{90'} &= 2^3 \cdot 10^5 = 8 \cdot 10^5 \dots\dots\dots \log N_{90'} = 5,9 \\
 N_{180'} &= 2^6 \cdot 10^5 = 6,4 \cdot 10^6 \dots\dots\dots \log N_{180'} = 6,8
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 N_{\text{inicc}} &= 10^5 \dots\dots\dots \log N_{\text{inicc}} = 5 \\
 N_{30'} &= 2 \cdot 10^5 \dots\dots\dots \log N_{30'} = 5,3 \\
 N_{60'} &= 2^2 \cdot 10^5 = 4 \cdot 10^5 \dots\dots\dots \log N_{60'} = 5,6 \\
 N_{90'} &= 2^3 \cdot 10^5 = 8 \cdot 10^5 \dots\dots\dots \log N_{90'} = 5,9 \\
 N_{180'} &= 2^6 \cdot 10^5 = 6,4 \cdot 10^6 \dots\dots\dots \log N_{180'} = 6,8
 \end{aligned}$$

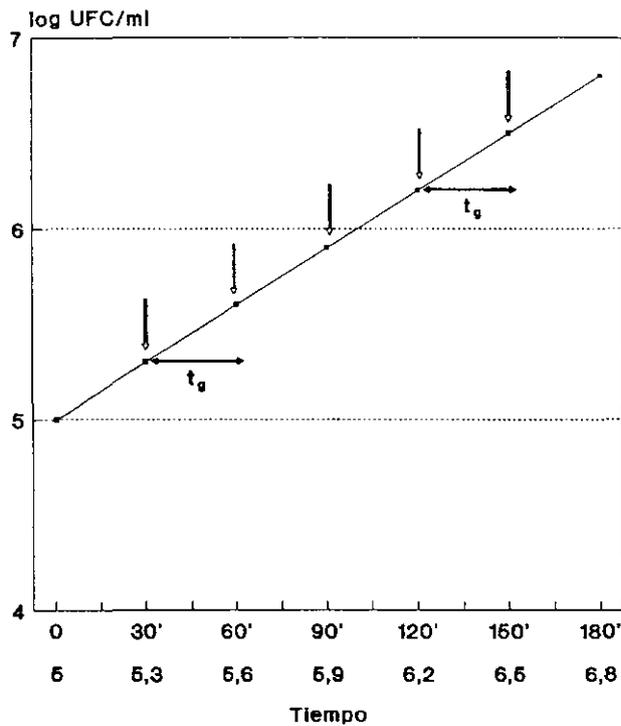


Figura 9.- Representación teórica normal del crecimiento logarítmico de una bacteria con tiempo de generación 30' y  $N_{\text{inicc}} = \log 10E5 \text{ UFC/ml}$

Evidentemente el tiempo de generación -  $t_g$  - puede calcularse muy facilmente a partir de esta gráfica midiendo en cualquier zona de la recta el tiempo que tarda en duplicarse el número de bacterias ó también diluyendo el cultivo ( sin alterar las condiciones de inoculación ) por ejemplo 1/2 y calculando el

tiempo necesario para recuperar el número original de bacterias. Si diluimos a 1/2 este tiempo será el tiempo de generación y si diluimos por ejemplo 1/8 este tiempo será 3 veces (  $2^3 = 8$  ) el tiempo de generación.

#### 3.2.2.2. MEDIDA DEL CRECIMIENTO BACTERIANO USANDO RECUEENTOS VIABLES

Los recuentos viables miden concentración de organismos vivos ( Meynell & Meynell, 1970 ).

Se basa en la inoculación periódica sobre la superficie del agar nutriente de un volumen determinado de la suspensión bacteriana a medir, distribuyéndolo bien por la placa. Si la densidad celular es muy grande, se debe diluir la suspensión y luego inocular.

Tras la incubación de las placas se procede al recuento del número de colonias.

La precisión del recuento está limitada por los errores técnicos y los errores de muestreo.

Dentro de los errores técnicos destacaríamos los sistemáticos, producidos al hacer las diluciones del cultivo previas a la inoculación, estos se pueden obviar utilizando la misma pipeta y realizando las diluciones la misma persona y de la misma manera ( Meynell & Meynell, 1970 ) y los debidos al azar, como por ejemplo cuando se producen cambios esporádicos en el volumen que se inocular en la placa; estos últimos no incrementan tanto el error total como lo haría los errores sistemáticos ya que este caso se producen siempre hacia una dirección, bien aumentando o disminuyendo el inóculo.

En cuanto a los errores de muestreo, es evidente que cuando el inóculo medio por placa contiene un número pequeño de organismos, el número de colonias contadas puede diferir, ya que estos organismos están distribuidos al azar en el cultivo. La imprecisión introducida por tal fluctuación sería superada inoculando varias placas a la vez y calculando luego el número medio de colonias por placa ( Meynell & Meynell, 1970 ).

La precisión aumenta conforme lo hace el número medio de colonias contadas en las placas pues, al seguir los recuentos una distribución de Poisson, si se cuentan "n" colonias la desviación estándar es " $\sqrt{n}$ " y el error relativo en la determinación del número bacteriano es " $\sqrt{n}/n$ " , por tanto se reduce conforme se incrementa "n" (Richards et al.,1978). Cuando se sobrepasan las 600-1000 colonias, el trabajo de recuento es muy laborioso y hay una pérdida de precisión. Lo ideal es que se disponga entre 30 y 300 colonias por placa (Koch A.L.,1981).

### 3.2.2.3. MEDIDA DEL CRECIMIENTO BACTERIANO POR ESPECTROFOTOMETRIA

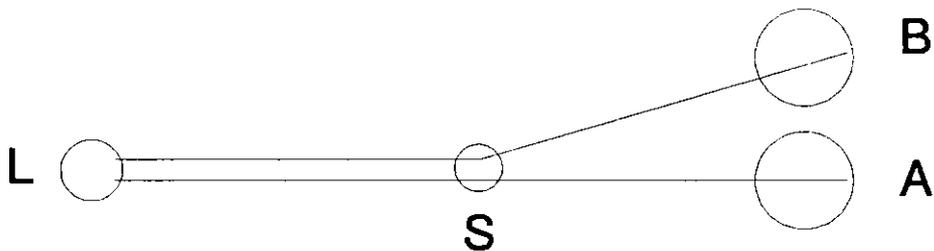
Desde el punto de vista de los estudios bioquímicos, el crecimiento bacteriano acostumbra a definirse en términos de masa de material celular, mientras que en estudios genéticos o infectivos se habla más de número de células (Davis et al.,1984).

La masa celular puede determinarse directamente en términos de peso seco o indirectamente en términos de volumen total celular o contenido de nitrógeno. Con mucho, el índice más útil para determinar la masa celular es la turbidez ( Davis et al.,1984 ).

Conforme las células de un cultivo bacteriano en medio líquido se multiplican ocasionan una turbidez del medio que puede

ser apreciada bien por el ojo humano o utilizando aparatos medidores. Podemos hacer pasar un rayo de luz a través de esa suspensión bacteriana, una parte de la energía luminosa es absorbida por el cultivo, otra atraviesa el cultivo sin experimentar cambios en su trayectoria original y otra es desviada de dicha trayectoria.

Según se mida la proporción de luz que se transmite o la que se desvía estaremos hablando de Turbidimetría o Nefelometría ( Figura 10 ).



**Figura 10:** Desviación de la luz por una suspensión bacteriana.  
 L: Fuente de luz.      S: Suspensión bacteriana.  
 A: Luz transmitida (medida por Espectrofotometría).  
 B: Luz desviada ( medida por Nefelometría ).

Koch en 1981 y Davis et al. en 1984 demostraron que en la relación turbidez - densidad celular, esta última es más exactamente definida como masa celular que como número de células, ya que aunque en un punto dado en la curva de

crecimiento bacteriano pueda existir una relación constante entre número y masa, que además es reproducible, esta relación podría no existir para otros puntos de la curva de crecimiento, porque las bacterias pueden variar en su tamaño dependiendo de la edad del cultivo ( Harder et al., 1977; Hershey & Bronfenbrenner, 1938; Toennies & Gallant, 1949 ) y de otros factores.

Con esta técnica medimos directamente masa celular, no número de células. Sólo nos proporcionaría una medida del número de células cuando todas las bacterias tuvieran el mismo tamaño, como ocurre en los cultivos viejos (Kavanagh, 1963) aunque, en este caso, debe tenerse en cuenta que se puede detectar tanto microorganismos metabólicamente activos (vivos) como inactivos (muertos) (Hanberger et al., 1991). Existe una relación directa lineal entre la absorción de luz de una suspensión celular y la concentración bacteriana por unidad de volumen de dicha suspensión. Esta relación sin embargo sólo tiene lugar, dependiendo de la técnica utilizada, a concentraciones bacterianas entre  $10^6$  y  $10^{8-9}$  UFC/ml, por encima de dicho nivel un aumento de la masa celular se traduce en mínimos cambios de la absorción de luz medida espectrofotométricamente (Koch, 1981); (Carlberg, 1986).

Bajo condiciones ideales, podríamos establecer una relación lineal entre la atenuación de la luz de una suspensión celular y su densidad celular de forma análoga a como se expresa en la ley de Beer-Lambert para verdaderos solutos. Esta ley establece que para una longitud de onda específica existe una relación lineal entre la absorbancia de una solución y la concentración del soluto ( en este caso la concentración bacteriana ) (Carlberg, 1986).

La luz incidente  $I_0$  y la luz transmitida  $I$  ( o sea, luz no desviada) están relacionadas a bajas concentraciones por esta ley de la siguiente manera:

(7)

$$I = I_0 10^{-\epsilon l N}$$

donde " $\epsilon$ " es el coeficiente de extinción, una constante característica del soluto ( en este caso de la bacteria ) y de la longitud de onda de la luz, " $l$ " la longitud de la trayectoria de la luz a través de la solución ( grueso de la cubeta ) y " $N$ " la concentración ( UFC/ml ) de la suspensión bacteriana.

(8)

$$\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = -\epsilon l N$$

(9)

$$\log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon l N$$

Al término  $\log ( I_0/I )$  se le denomina absorbancia (densidad óptica) que es lo que se determina experimentalmente en los espectrofotómetros y fotocolorímetros.

Así,

(10)

$$\log\left(\frac{I_0}{I}\right) = Abs$$

(11)

$$Abs = \epsilon l N$$

(12)

$$N = \frac{1}{\epsilon l} Abs$$

Esto es, el cambio de la extinción producida por el cambio de la concentración bacteriana ( N ) depende de la longitud de la trayectoria de la luz a través de la suspensión ( l ) y de sus propiedades intrínsecas expresadas por  $\epsilon$ . El valor de  $\epsilon$  cambia según las diferentes especies bacterianas e incluso según la misma especie tratada de diferentes formas ( Meynell & Meynell, 1970 ).

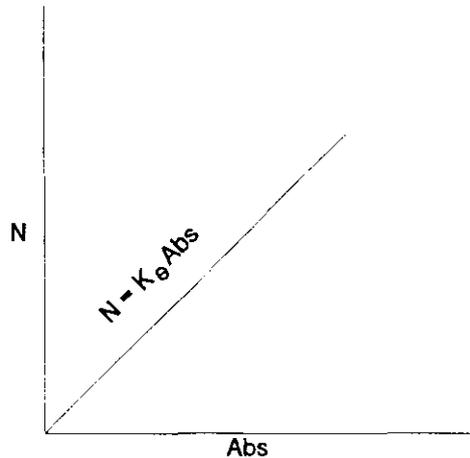
Para unas condiciones experimentales dadas ( una misma cepa bacteriana, un mismo medio de cultivo y un mismo aparato ) " $1/\epsilon l$ " es una constante y entonces

$$N = K_e Abs$$

(13)

de tal manera que la representación gráfica ( en un cultivo bacteriano en crecimiento ) de la concentración de bacterias (N)

frente a la Absorbancia, nos da una línea recta que pasa por el origen con pendiente  $K_e$  ( Figura 11 ).



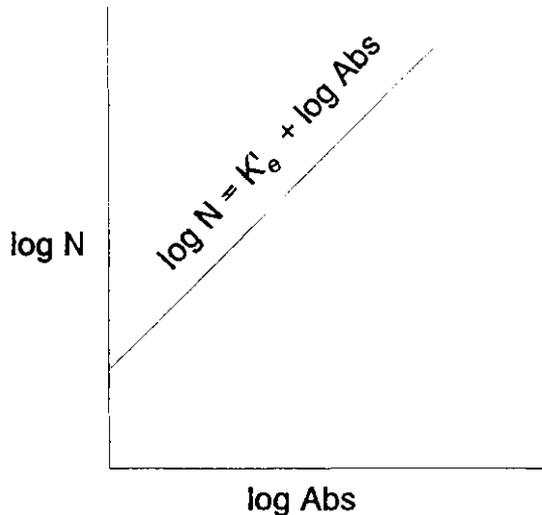
**Figura 11:** Representación gráfica de la concentración bacteriana ( N ) frente a la Absorbancia ( Abs ) del cultivo

Siempre que estemos estudiando la misma especie o cepa bacteriana en cultivos jóvenes de la misma edad, tratados de idéntica manera incluyendo, el tipo de medio de crecimiento, condiciones de cultivo etc., la comparación de la curva de crecimiento de esa bacteria utilizando recuentos viables en placa y la medida de la absorbancia por espectrofotometría, nos dará respecto al tiempo dos curvas paralelas (Carlberg, 1986); (Coulter & Hutchison, 1962).

Tomando logaritmos en la ecuación 13:

$$\log N = K'_e + \log \text{Abs} \quad (14)$$

y la representación del  $\log N$  frente al  $\log \text{Abs}$  es también una recta como se representa en la **Figura 12**



**Figura 12 .-** Representación gráfica logarítmica de la concentración bacteriana (N) frente a la Absorbancia ( Abs ) del cultivo

La representación gráfica de la absorbancia frente a la concentración bacteriana aplicando esta fórmula ( ecuación 14 ) y otras con igual significado desarrolladas por Toennies & Gallant, 1949 y Koch, 1970, nos da una línea recta cuya inclinación está determinada por  $e_1$  ( Meynell & Meynell, 1970 ).

Sin embargo, la absorbancia real se incrementa menos de lo que la regla predice principalmente cuando aumenta la concentración bacteriana, ya que la luz desviada por una bacteria es vuelta a desviar por otra que la dirige hacia el interior del fototubo y también porque una bacteria interfiere el movimiento Browniano de otras, de forma que se distribuyen más uniformemente y la luz diverge menos de su trayectoria inicial disminuyendo la luz desviada fuera del rayo (Koch, 1981). Por tanto, la ley de Beer-Lambert no vale para altas concentraciones bacterianas porque es infraestimada. El rango de concentraciones a las cuales esta ley puede ser aplicada depende particularmente de la longitud de onda del rayo incidente (Gerrard, Parker & Porter, 1961) ( Figura 13 ).

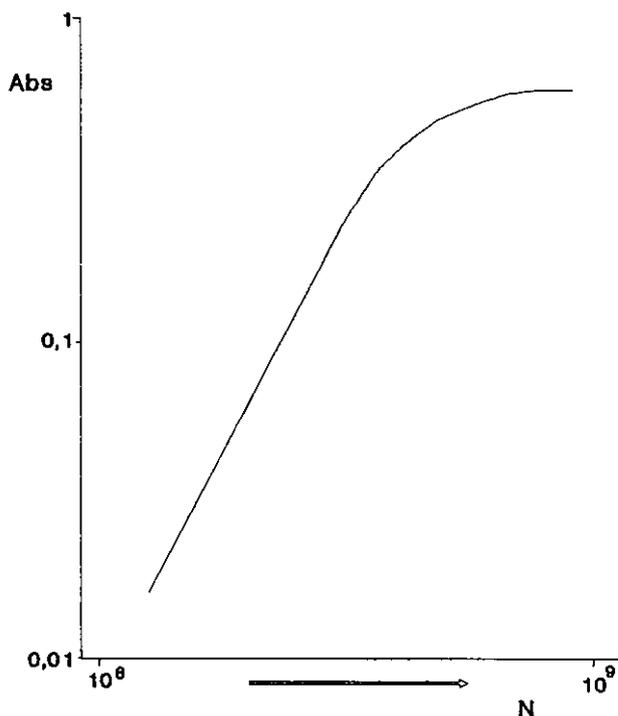


Figura 13.-Esquema de representación logarítmica del aumento de la Absorción (Abs) con el aumento de la Concentración bacteriana (N)

La relación entre concentración bacteriana y extinción (absorción) está gobernada en parte por el estado de los organismos. Se pueden distinguir tres situaciones ( Meynell & Meynell, 1970):

(1) En cultivos en crecimiento, la extinción normalmente se muestra proporcional a la masa bacteriana medida como peso seco o nitrógeno bacteriano, con indiferencia del medio de cultivo y de si su división es sincrónica o asincrónica.

(2) Si la concentración de constituyentes intracelulares cambia, las células se hinchan o encogen por la entrada o pérdida de agua. De este modo, cuando la presión osmótica del medio baja, los organismos Gram negativos (pero no los Gram positivos) se hinchan, desviando menos la luz y descendiendo la extinción. Tales cambios podrían obviamente ser engañosos si las muestras del cultivo son diluídas en diferentes medios antes de que se efectúe la lectura.

(3) Cuando las células tienen una forma y composición constante pero dejan de estar dispuestas fortuitamente en la suspensión, se producen cambios en la turbidez que son vistos como remolinos cuando el cultivo es manipulado y visto con el ojo, provocando errores en la lectura.

Si tenemos un cultivo bacteriano en fase logarítmica con un tiempo de generación  $t_g$  y, en un momento determinado ( tiempo inicial -  $t_{inic}$  - ), su concentración de bacterias ( UFC/ml ) es  $N_{inic}$  y la lectura del espectrofotómetro es  $Abs_{inic}$  ( ecuación 13 )

$$N_{inic} = K_e Abs_{inic}$$

al cabo de un tiempo  $t$  ( ecuación 13 )

$$N_t = K_e \text{Abs}_t$$

dado que ( ecuación 3 )

$$N_t = N_{\text{inic}} 2^{t/t_g}$$

$$K_e \text{Abs}_t = K_e \text{Abs}_{\text{inic}} 2^{t/t_g} \quad (15)$$

simplificando

$$\text{Abs}_t = \text{Abs}_{\text{inic}} 2^{t/t_g} \quad (16)$$

tomando logaritmos

(17)

$$\log \text{Abs}_t = \log \text{Abs}_{\text{inic}} + t \frac{\log 2}{t_g}$$

sustituyendo ( ecuación 5 )

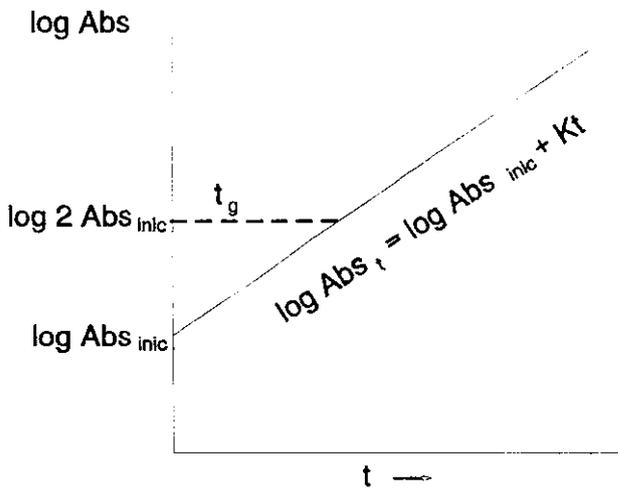
$$K = \frac{\log 2}{t_g}$$

$$\log \text{Abs}_t = \log \text{Abs}_{\text{inic}} + Kt \quad (18)$$

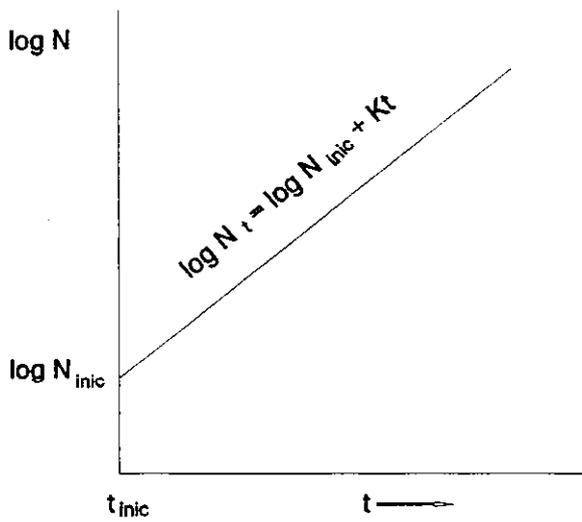
y como ( ecuación 6 )

$$\log N_t = \log N_{inc} + Kt$$

la curva obtenida representando ( en un cultivo bacteriano en fase exponencial ) el logaritmo de la absorbancia frente al tiempo ( **Figura 14** ), es paralela ( tienen la misma pendiente ) a la que se obtendría representando  $\log N$  ( en UFC/ml ) frente a tiempo ( **Figura 15** ).



**Figura 14.-** Representación del logaritmo de la Absorción (Abs) frente al tiempo ( t )



**Figura 15.-** Representación del logaritmo de la concentración bacteriana ( N ) frente al tiempo ( t )

#### 3.2.2.4. CALCULO GRAFICO DEL TIEMPO DE GENERACION

El tiempo de generación, o tiempo que la población bacteriana tarda en duplicarse cuando está en crecimiento exponencial, es fácilmente calculable a partir de la representación gráfica de la ecuación 18:

$$\log \text{Abs}_t = \log \text{Abs}_{\text{inic}} + Kt$$

o de la representación gráfica de la ecuación 6:

$$\log N_t = \log N_{\text{inic}} + Kt$$

midiendo, en cualquier punto de ellas, el tiempo que tarda en duplicarse Abs ( Figura 14 ) ó N ( Figura 15 ).

Otra forma fácil de calcular el tiempo de generación sería diluir ( sin alterar las condiciones de crecimiento ) un cultivo en fase logarítmica un número de veces p.e. 2, 4, u 8 y determinar el tiempo en que la Abs o el recuento vuelven a igualar los valores originales; este tiempo será  $t_g$  ,  $2 t_g$  ó  $3 t_g$  etc.

### 3.2.2.5. AJUSTE DE UNA CURVA ESPECTROFOTOMETRICA A LA DINAMICA DE CRECIMIENTO

Supongamos que un cultivo bacteriano en fase logarítmica de crecimiento es seguido espectrofotométricamente a partir de un tiempo inicial ( $t_{inic}$ ), midiendo su Absorbancia ( $Abs$ ) cada cierto tiempo.

Así mismo, determinamos experimentalmente la densidad bacteriana por recuentos viables en el  $t_{inic}$  ( $N_{inic}$ ).

Si construimos una gráfica representando en una escala en ordenadas log de  $Abs$  y tiempo en abscisas (Figura 16); sobre esa misma gráfica, dado que la representación de  $\log N$  frente a  $t$  es también una recta con la misma pendiente ( $K$ ), podemos superponer una escala de  $N$  en el mismo eje de ordenadas (Figura 16).

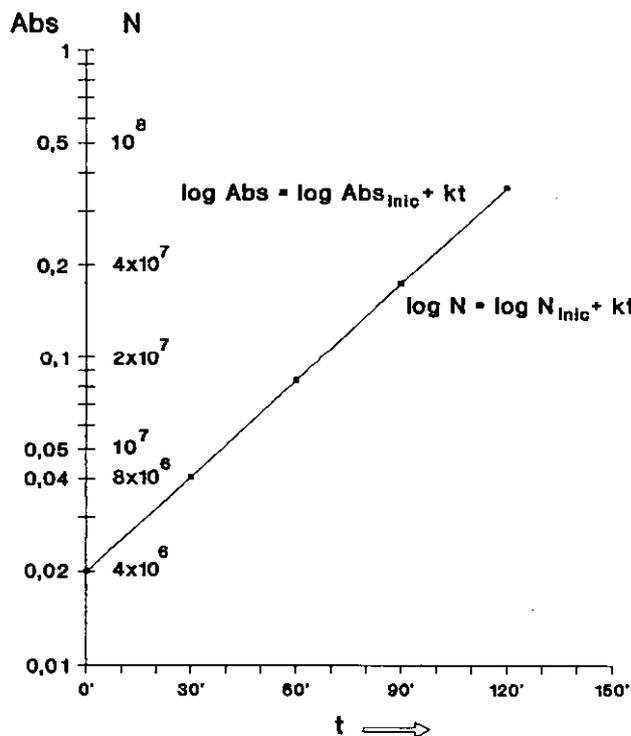


Figura 16.- Hipotética curva de ajuste de la Absorbancia ( $Abs$ ) a los Recuentos Bacterianos ( $N$ )

### 3.2.3. CALCULO DEL EPA A PARTIR DE LOS DATOS DE CRECIMIENTO BACTERIANO

A continuación vamos a describir como es posible calcular el EPA a partir del conocimiento de tres datos obtenibles experimentalmente y que constituyen la clave del nuevo método propuesto para la determinación del EPA:

1): Separación en el tiempo de las curvas de crecimiento de un cultivo en fase exponencial y de una alícuota de ese cultivo tratada con un antibiótico que después es eliminado, tiempo de separación (  $t_{sep}$  ).

2): Concentración de bacterias en el cultivo antes de aplicar el antibiótico (  $N_{inic}$  ).

3): Concentración de bacterias en la alícuota del cultivo tratado con el antibiótico inmediatamente después de eliminar el mismo (  $N_{anti}$  ).

Sea un cultivo bacteriano en fase de crecimiento logarítmico, con un tiempo de generación  $t_g$  y una concentración de bacterias ( UFC/ml )  $N_{inic}$  ( determinable experimentalmente por recuentos viables ).

Una porción de este cultivo es expuesto a una concentración ( no totalmente letal ) de antibiótico durante un periodo de tiempo, tiempo de exposición (  $t_{expo}$  ), prefijado en la experiencia.

Después de la exposición el antibiótico es eliminado, continuandose la incubación en las mismas condiciones.

En el momento de eliminar el antibiótico la concentración bacteriana de este cultivo será  $N_{anti}$  ( determinable experimentalmente por recuentos viables ).

Llamaremos  $r$  al efecto bactericida

(19)

$$r = \frac{N_{inic}}{N_{anti}}$$

En general  $N_{anti}$  será menor que  $N_{inic}$  ( antibiótico bactericida subletal ) y será necesario un número "  $n$  " de generaciones bacterianas para que el cultivo tratado con antibiótico recupere, una vez eliminado el antibiótico, la concentración inicial de bacterias (  $N_{inic}$  ) ( ecuación 2, pag. 42 )

$$N_{inic} = N_{anti} 2^n$$

(20)

$$\frac{N_{inic}}{N_{anti}} = 2^n$$

$$r = 2^n \quad (21)$$

(22)

$$n = \frac{\log r}{\log 2}$$

Llamamos tiempo de recrecimiento teórico,  $t_{recre}$ , al tiempo que sería necesario para que en el cultivo tratado, tras la eliminación del antibiótico, se sucedieran un número " n " de generaciones con un tiempo de generación,  $t_g$ , que permitieran que ese cultivo en fase exponencial de crecimiento alcanzara la concentración bacteriana inicial (  $N_{inic}$  ).

(23)

$$t_{recre} = nt_g = \frac{\log r}{\log 2} t_g$$

A modo de ejemplo representaremos gráficamente diversos supuestos

a) Cultivo bacteriano en fase exponencial del que una alícuota es expuesta durante un tiempo teóricamente despreciable (  $t_{expo} = 0$  ) a un antibiótico parcialmente bactericida (Sin EPA) que es inmediatamente eliminado y provoca un descenso de la concentración de bacterias de  $N_{inic}$  a  $N_{anti}$  ( **Figura 17** ).

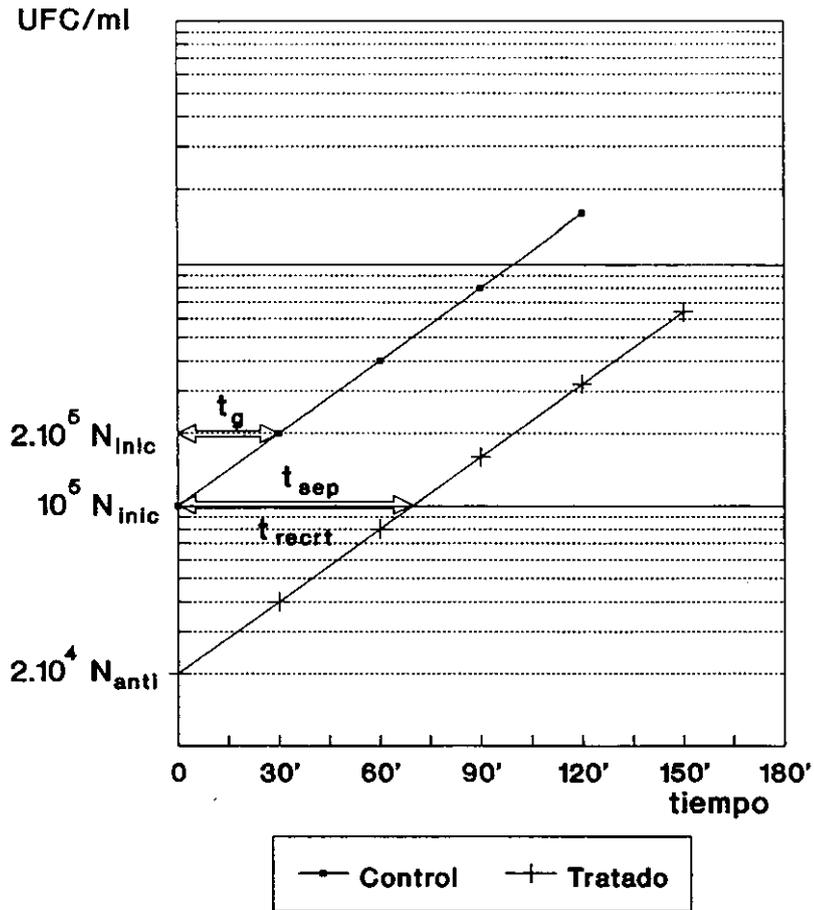


Figura 17.- No EPA. Antibiótico bactericida y tiempo de exposición = 0

$N_{inic} = 10^5$  y  $N_{anti} = 2 \cdot 10^4$  ( ambos determinados por recuentos viables ) ;  $t_g = 30$  min. (determinado gráficamente por la separación en tiempo de 2 curvas de crecimiento en fase logarítmica correspondientes una a un cultivo sin diluir y otra al mismo cultivo a una dilución dada : Sección 3.2.2.4.) .

$$r = \frac{10^5}{2 \cdot 10^4} = 5$$

En este caso ( al ser  $t_{\text{expo}} = 0$  y además no haber EPA ) :  
 $t_{\text{sep}} = t_{\text{recrec}}$  ( el tiempo de separación entre curvas es igual al tiempo de recrecimiento desde  $N_{\text{anti}}$  a  $N_{\text{inic}}$  ).

$$n = \frac{t_{\text{recrec}}}{t_g} = \frac{\log r}{\log 2}$$

$$t_{\text{sep}} = t_{\text{recrec}} = t_g \frac{\log r}{0,3}$$

$$t_{\text{sep}} = t_{\text{recrec}} = 30 \frac{\log 5}{0,3} = 70 \text{min}$$

( determinable experimentalmente midiéndolo sobre la gráfica )

Es decir el tiempo de separación de las dos curvas viene sólo determinado por el efecto parcial bactericida, pues el tiempo de exposición al antibiótico ha sido 0 y además no ha habido EPA.

b) Cultivo bacteriano sometido a la acción de un agente antimicrobiano que se añade a concentración bacteriostática y no tiene EPA. En este caso, obtendremos dos curvas de crecimiento paralelas ( la del cultivo control y la del expuesto ), que parten del mismo recuento bacteriano, ya que no ha habido muerte celular y que están separadas el tiempo de exposición ,  $t_{\text{expo}}$  ( Figura 18 ).

En este caso:  $t_{\text{sep}} = t_{\text{expo}} = 60 \text{ min.}$  y  $r$  ( ecuación 19 ) = 0

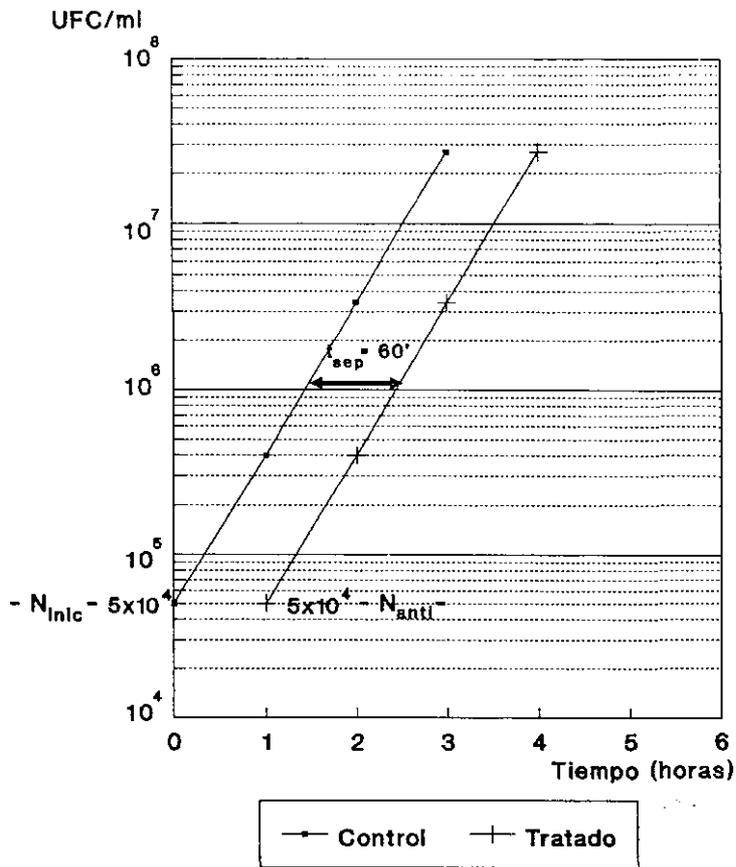


Figura 18.- No EPA. Antibiótico a concentración bacteriostática y tiempo de exposición 60'

c) Cultivo bacteriano en fase exponencial del cual una alícuota es expuesta durante un tiempo ( $t_{\text{expo}}$ ) a un antibiótico parcialmente bactericida (Sin EPA) y que es eliminado después del  $t_{\text{expo}}$ , tras provocar un descenso de la concentración de bacterias de  $N_{\text{inic}}$  a  $N_{\text{anti}}$  ( Figura 19 ).

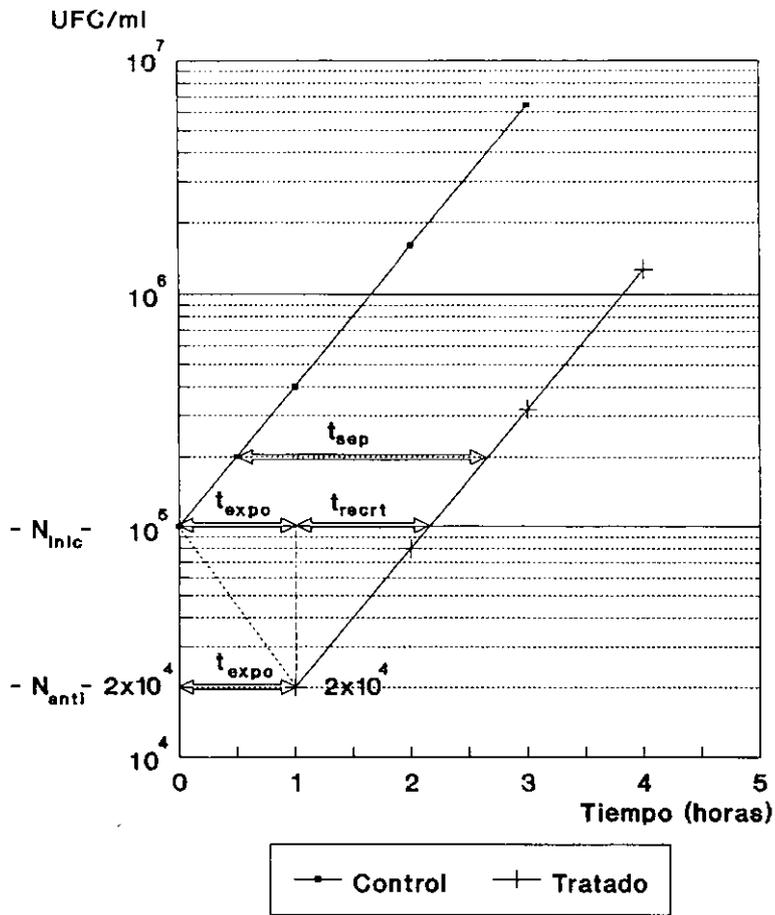


Figura 19.- No EPA. Antibiótico bactericida y tiempo de exposición 60'

$N_{inic} = 10^5$  y  $N_{anti} = 2 \cdot 10^4$  ( determinados por recuentos viables )

$$r = \frac{10^5}{2 \times 10^4} = 5$$

$t_{\text{expo}} = 60 \text{ min}$  ( parámetro fijado en el experimento ) y  
 $t_g = 30 \text{ min}$  ( determinado gráficamente: Sección 3.2.2.4. ).

El tiempo de separación entre las curvas de crecimiento del cultivo sin tratar y tratado (  $t_{\text{sep}}$  ), tiempo que es calculable gráficamente será:

$$t_{\text{sep}} = t_{\text{expo}} + t_{\text{reert}} = t_{\text{expo}} + t_g \frac{\log r}{\log 2} = 60' + 30' \frac{\log 5}{\log 2} = 130'$$

lógicamente este tiempo de separación entre curvas es el mismo que el del experimento teórico " a " aumentado en los 60 min del tiempo de exposición.

d) Cultivo bacteriano en fase exponencial con un tiempo de generación  $t_g$  ( medido experimentalmente ) de 30 min y una densidad bacteriana inicial (  $N_{\text{inic}}$  ) de  $10^5 \text{ UFC/ml}$ .

Una alícuota es tratada con un antibiótico bactericida ( subletal ) durante un tiempo de exposición (  $t_{\text{expo}}$  ) de 60 min, que reduce su concentración bacteriana de  $N_{\text{inic}} = 10^5 \text{ UFC/ml}$  a  $N_{\text{anti}} = 2 \cdot 10^4 \text{ UFC/ml}$ .

Una vez eliminado el antibiótico se necesita un tiempo ( Efecto Postantibiótico, EPA ) para recuperar la fase logarítmica de crecimiento, cuya gráfica está separada de la gráfica de crecimiento del cultivo control por un tiempo de separación,  $t_{\text{sep}}$ , ( medible experimentalmente, 170 min ).

De acuerdo con la definición estándar del EPA (Sección 1.1.)

$$\text{EPA} = T - C \quad (1)$$

siendo T, el tiempo necesario para que el cultivo tratado, una vez se ha eliminado el antibiótico, pase de  $N_{\text{anti}}$  a  $10 N_{\text{anti}}$  y C, el tiempo necesario para que el cultivo sin tratar pase de  $N_{\text{inic}}$  a  $10 N_{\text{inic}}$ .

En la Figura 20 se observa que los dos triángulos rectángulos sombreados son iguales, pues tienen iguales el cateto vertical ( paso de N a  $10 N$  ) y el ángulo  $\alpha$  ( misma pendiente en las rectas de crecimiento logarítmico ).

El EPA es medible sobre la línea T o sobre la línea  $t_{\text{sep}}$

$$t_{\text{sep}} = t_{\text{expo}} + t_{\text{reert}} + \text{EPA}$$

$$\text{EPA} = t_{\text{sep}} - t_{\text{expo}} - t_{\text{reert}}$$

$$\begin{aligned} \text{EPA} &= t_{\text{sep}} - 60' - t_g \log r / \log 2 = \\ &= 170' - 60' - 30' \log 5 / \log 2 = 40 \text{ min} \end{aligned}$$

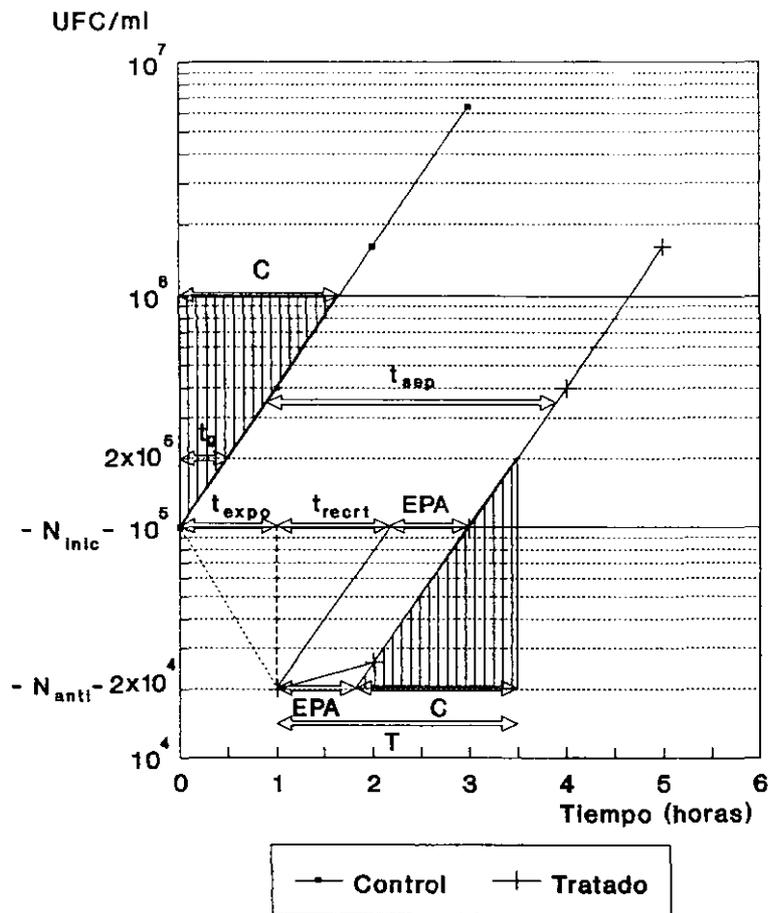


Figura 20.- EPA. Antibiótico bactericida

e) El último de los supuestos teóricos que formulamos es cuando el agente antimicrobiano se añade a concentración subinhibitoria y tiene EPA sobre el cultivo bacteriano estudiado ( antibiótico parcialmente bacteriostático con EPA ). En este supuesto no hay muerte celular sino que, por el contrario, la población bacteriana ha seguido creciendo durante el tiempo que duró el contacto con el antibiótico. Por tanto el  $t_{recr}$  es negativo. Pero además, una vez eliminado el agente antimicrobiano, las células no recuperan su velocidad de

crecimiento normal hasta que no finaliza el EPA de la droga, como lo refleja la Figura 21.

La fórmula del EPA quedaría:

$$\text{EPA} = t_{\text{sep}} - 60' - (-t_{\text{recrect}}) = t_{\text{sep}} - 60' + t_{\text{recrect}}$$

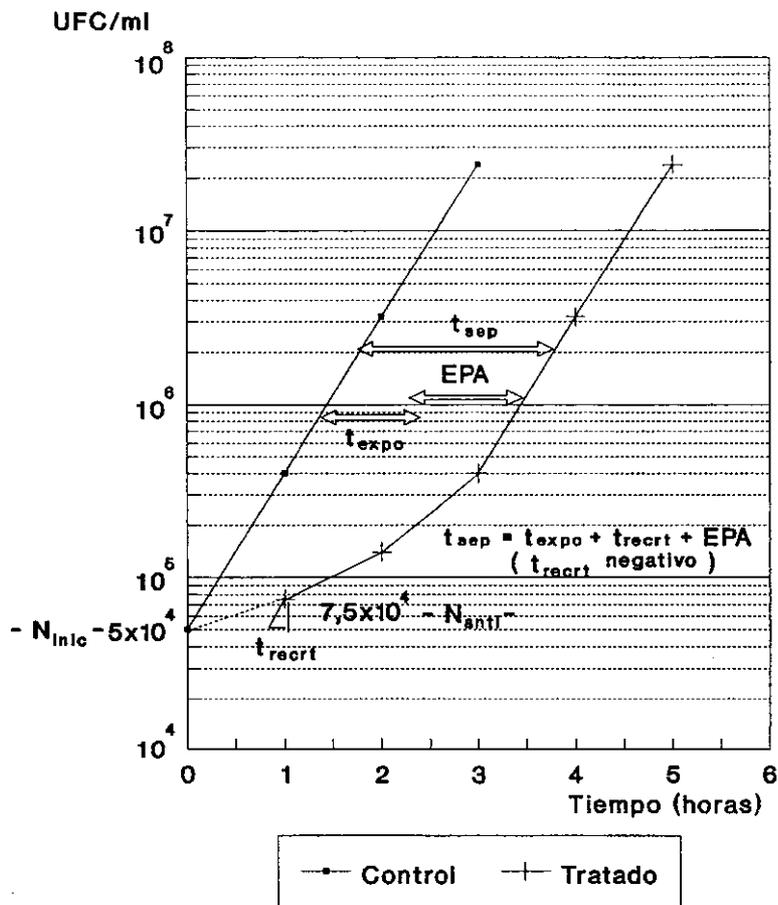


Figura 21.- EPA. Antibiótico a concentración subinhibitoria

### 3.2.4.DETERMINACION FOTOMETRICA DEL EFECTO POSTANTIBIOTICO

#### 3.2.4.1. PREPARACION DEL INOCULO

El día antes de la realización de la prueba, se picaron 2-3 colonias de un cultivo joven (18-24 hs) del microorganismo (en agar Mueller-Hinton) a estudiar y se dispensaron en 50 ml de caldo de Mueller-Hinton precalentado a 35°C.

Se dejó incubar toda la noche en la cámara caliente a 35-37°C.

A la mañana siguiente, 2 gotas de este caldo (con la bacteria en fase estacionaria de crecimiento) se inocularon en un frasco con 75 ml de caldo de Mueller-Hinton precalentado el cual se coloca al baño maría en agitación.

De este frasco se extrajo un volumen aproximado de 8 ml que se vierten en un tubo de espectrofotómetro, que también se mantiene en baño maría y en agitación. Con objeto de uniformar lo más posible el inóculo inicial en todas las determinaciones del EPA, el seguimiento del crecimiento se realizó por medida cada 30 min. de los cambios de la absorbancia de la suspensión contenida en este tubo.

Se considera el inicio de la prueba:  $t_{inic}$  (tiempo inicial), cuando el cultivo alcanza una absorbancia de 0,1 (unas 4 horas) que equivale a  $2-5 \times 10^7$  UFC/ml y la bacteria está en fase logarítmica de crecimiento. A este cultivo lo llamaremos en adelante cultivo previo o inicial.

### 3.2.4.2. PREPARACION DEL TUBO CONTROL

En este momento (  $t_{inic}$  ) se realizó una dilución  $10^{-3}$  inoculando  $100 \mu\text{l}$  de este cultivo bacteriano previo de absorbancia 0,1 en 100 ml de caldo de Mueller-Hinton precalentado a  $35^{\circ}\text{C}$ , con ello obtendremos una suspensión bacteriana de aproximadamente  $2-5 \times 10^4$  UFC/ml. Esta dilución es análoga a la que habrá que efectuar para eliminar el efecto del antibiótico en los cultivos expuestos. Este nuevo frasco nos sirve de control ( cultivo control ).

Para conocer con exactitud el inóculo inicial en cada prueba, se realiza inmediatamente ( a tiempo inicial ) un recuento viable en placa del cultivo control que nos dará  $N_{inic}$ . Para ello se somete a diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ . De cada dilución tomamos  $100 \mu\text{l}$  que se extiende en la superficie del agar mediante un asa estéril. Estos recuentos se efectúan por triplicado. Sólo se consideran útiles las placas que contienen entre 30 y 300 colonias. A partir de estos contajes se calculó el  $N_{inic}$

$$N_{inic}(\text{UFC/ml}) = \frac{\Sigma \text{contaje}}{0,33} \times 10$$

### 3.2.4.3. EXPOSICION AL AGENTE ANTIMICROBIANO

El cultivo inicial es expuesto durante una hora a distintas concentraciones del agente antimicrobiano que vamos a ensayar: cultivos con antibiótico.

Para ello se disponen de tubos de vidrio estériles en los que se mezclan 10 ml del cultivo inicial con un volumen preciso del agente antimicrobiano a la concentración que deseamos ensayar.

Una vez homogeneizados todos los tubos se mantienen durante una hora a 37°C y en agitación.

#### 3.2.4.4. ELIMINACION DEL EFECTO DEL AGENTE ANTIMICROBIANO

Transcurrida 1 hora (tiempo de exposición) desde que se añade el antibiótico, se procede a la eliminación del efecto del agente antimicrobiano por dilución  $10^{-3}$  disponiendo 50  $\mu$ l del cultivo con antibiótico en 50 ml de caldo de Mueller-Hinton sin antibiótico precalentado a 35°C: cultivos postantibiótico.

#### 3.2.4.5. DETERMINACION DEL EFECTO DEL AGENTE ANTIMICROBIANO

Una vez eliminado el antibiótico ( $t_{\text{expo}}$  ; tiempo exposición = 1 hora), se realizan diluciones para recuentos bacterianos de los cultivos expuestos a los antibióticos.

El efecto bactericida se calcula en base a los recuentos viables en placa anteriormente citados y corresponde al cociente formado por las UFC/ml del cultivo control a tiempo inicial ( $N_{\text{inic.}}$ ) y las UFC/ml del cultivo con antibiótico tras la eliminación del antibiótico al cabo de una hora ( $N_{\text{anti}}$ ) (ecuación 19).

Por ejemplo, si hay una reducción desde 50.000 UFC/ml ( recuento a tiempo inicial del cultivo control ) a 5.000 UFC/ml el efecto bactericida sería:

$$r = \frac{50000}{5000} = 10$$

#### 3.2.4.6. CALCULO DEL EFECTO MULTINUCLEO

Cuando cultivos bacterianos de *E.coli* y *P.aeruginosa* eran tratados con piperacilina y ceftriaxona ( inducen formas filamentosas multinucleadas ) o imipenem, se realizaban extensiones en porta de los cultivos control y expuestos después de haber sido sometidos al proceso de eliminación de la droga. Estas extensiones se dejaban secar al aire y posteriormente eran teñidas y observadas al microscopio óptico con un aumento x1000. Se revisaban 100 bacterias y se apuntaba el número de núcleos que tenía cada una, sacando la media aritmética en cada cultivo. Este número medio era el factor de corrección que, multiplicado por el inóculo que habíamos obtenido por recuentos viables en agar después de eliminar el antibiótico, nos daba el recuento real ( $N_{anti}$ ).

Con ello se hacía notar las alteraciones morfológicas que estos fármacos imprimían en los bacilos Gram negativos arriba mencionados.

#### 3.2.4.7. MONITORIZACION ESPECTROFOTOMETRICA DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

Todos los tubos se incuban al baño maría a 37°C en agitación durante la realización de la prueba.

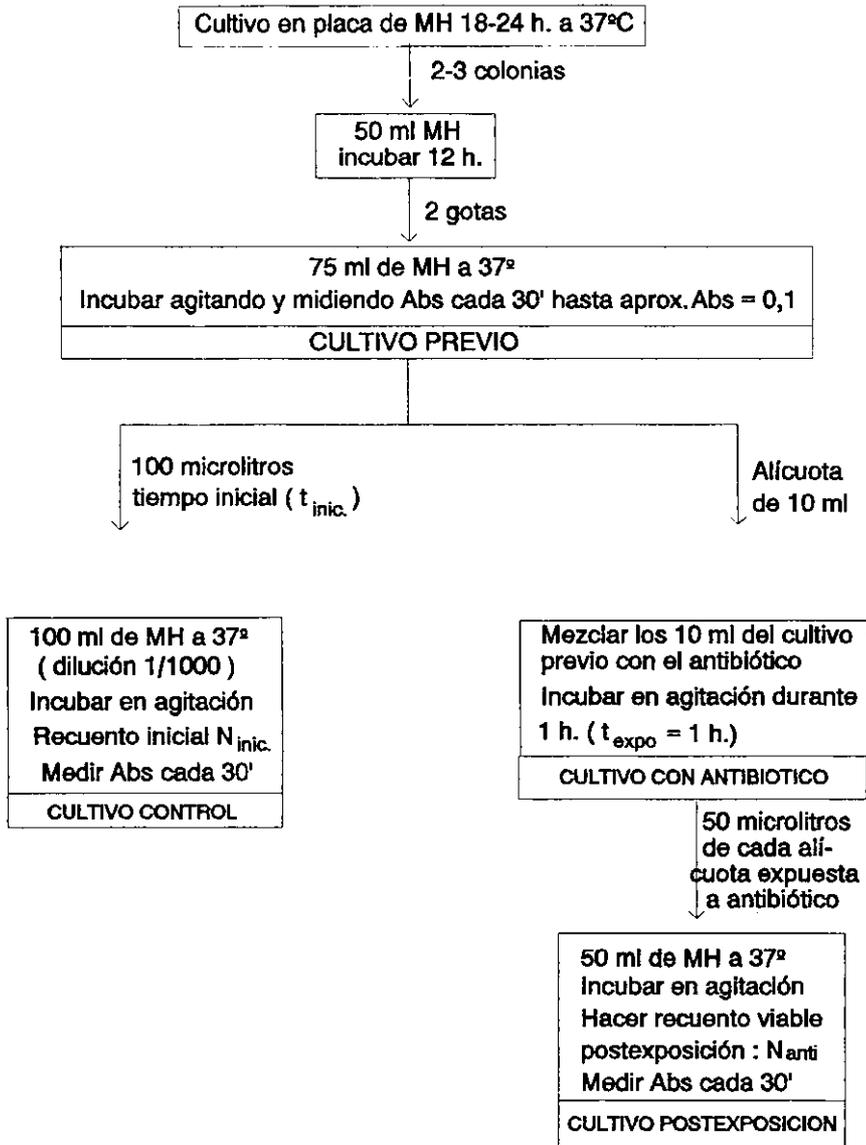
Las lecturas de la transmitancia se realizan cada media hora a partir de 2 horas ( pues antes no son detectables cambios de Absorción ) hasta que los cultivos alcanzan una turbidez notable ( densidad óptica  $\approx 0,7$  ) ya que, llegados a este punto, la sensibilidad del método desciende no detectándose cambios de turbidez en la suspensión bacteriana aunque existan aumentos en la concentración celular ( Sección 3.2.2.3. ).

Antes de efectuar la lectura en el espectrofotómetro los cultivos deben ser movidos en un agitador con el fin de que la suspensión bacteriana sea uniforme. La agitación debe ser cuidadosa para que no se formen burbujas de aire. Si a pesar de todo estas aparecen, se debe esperar unos 15- 30 segundos hasta que se desvanezcan y la lectura del cultivo se estabilize, ya que, el movimiento de las bacterias tras la agitación, puede provocar oscilaciones de las medidas realizadas por el espectrofotómetro. Esto ocurre principalmente con cultivos de bacilos, debido a la birrefringencia del flujo causado por estas formas.

La lectura en el espectrofotómetro nos facilita la Transmitancia del cultivo que después, con una tabla de conversión o con la fórmula, se expresan en medidas de densidad óptica (D.O.).

#### 3.2.4.8. RECUEENTOS BACTERIANOS EN AGAR

Tras la incubación de las placas inoculadas, se realizan los recuentos viables utilizando un contador de colonias.



### 3.2.4.9. REPRESENTACION GRAFICA DEL CALCULO DEL EPA

a) Prolongar la curva espectrofotométrica de crecimiento del control hasta que se corte con el eje de ordenadas ( escala semilogarítmica ) en el tiempo inicial  $t_{inic}$ .

b) Situar en este punto de corte en las ordenadas el valor de  $N_{inic}$ .

c) Superponer en el eje de ordenadas (semilogarítmico) la escala de concentraciones bacterianas, conservando la misma relación logarítmica usada para la escala de D.O.

d) Señalar en el gráfico el punto correspondiente a  $N_{anti}$  del cultivo postexposición.

e) Unir con una línea los puntos  $N_{inic}$  y  $N_{anti}$ .

f) Prolongar la recta de representación de los cultivos postantibiótico hasta el valor de concentración bacteriana  $10 N_{anti}$ .

g) Unir con una línea de puntos ( teórica ) los puntos  $N_{anti}$  y  $10 N_{anti}$ .

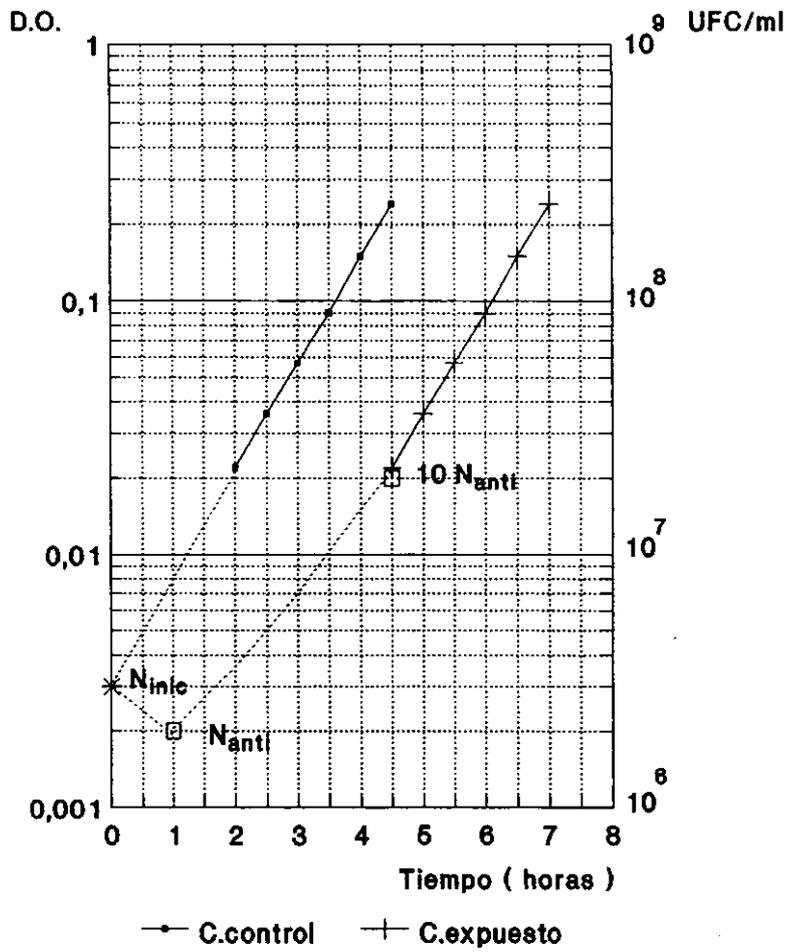


Figura 22.-Representación gráfica teórica del cálculo del EPA

### 3.2.4.10. CALCULO DEL EFECTO POSTANTIBIOTICO

Una vez realizadas las determinaciones de  $N_{inic}$  y  $N_{anti}$  y la monitorización fotométrica del crecimiento de los cultivos control y postantibiótico procedemos a:

1) Representación en papel semilogarítmico de las curvas de crecimiento, mostrando la densidad óptica (D.O.) en ordenadas y tiempos en abscisas, de los cultivos control y postexposición, que deben ser rectas y paralelas.

Habitualmente la primera lectura significativa de D.O. se podrá verificar en el cultivo control a los 120 ó 150 minutos desde  $t_{inic}$ .

2) Determinación del tiempo de generación  $t_g$  ( tiempo de duplicación ) en la parte media de la recta.

3) Calculo de  $r$  ( efecto bactericida ) ( ecuación 19 )

4) Determinación gráfica de la separación entre las curvas,  $t_{sep}$ .

5) Cálculo del EPA de acuerdo con la fórmula general ( Sección 3.2.3. ).

$$EPA = t_{sep} - t_{expo} - t_{reect} \quad (24)$$

### 3.2.4.11. VALIDACION DEL CALCULO DEL TIEMPO DE GENERACION

El  $t_{reect}$  ( tiempo de recrecimiento teórico ) o tiempo teórico que tarda el cultivo expuesto, una vez eliminado el antibiótico, en equiparar su recuento a  $N_{inic}$ , es consecuencia de la acción del agente antimicrobiano ensayado sobre la bacteria y depende por tanto del número de veces (  $n$  ) que el cultivo tratado debería

duplicarse para equiparar su concentración bacteriana con el inóculo inicial y del tiempo generación de la bacteria ( $t_g$ ). El  $t_g$ , se calcula a partir de la recta de crecimiento exponencial midiendo el tiempo que tarda en duplicarse el número de bacterias ( Figura 23 ) o la densidad óptica del cultivo ( Figura 24 ), o bien, a través de la monitorización espectrofotométrica del cultivo control y de una dilución 1/8 del mismo ( Figura 25 ), esta dilución está separada en el tiempo del control, 3 tiempos de generación (  $2^1 - 2^2 - 2^3 = 2 - 4 - 8$  ), dividiendo dicha separación por tres (  $1/2 - 1/4 - 1/8$  ) se obtiene el tiempo de duplicación ( que debe ser igual al calculado por la otra vía ).

Basándonos en la teoría del crecimiento bacteriano, cuando un cultivo está en fase logarítmica de crecimiento el tiempo de duplicación es constante, daría igual tomar durante este periodo cualquier dilución de ese cultivo (  $1/2 - 1/4 - 1/8 - 1/16 \dots$  ), porque la nueva curva de crecimiento sería paralela a la inicial, pero separada de ella tantos  $t_g$  (  $2^1 - 2^2 - 2^3 - 2^4 \dots$  ) como diluciones se hayan practicado.

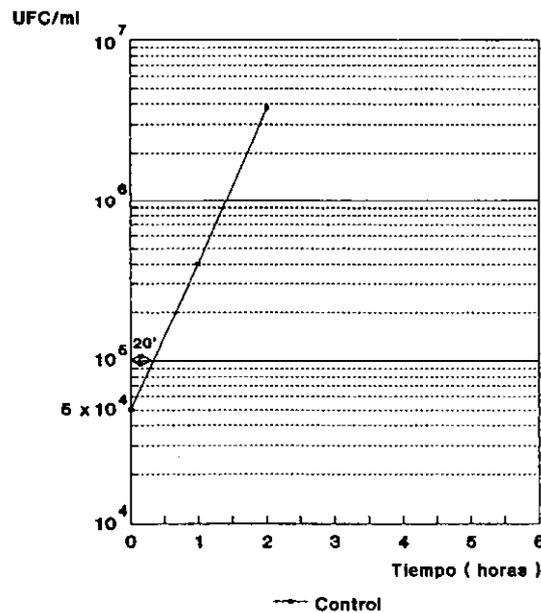


Figura 23.- Cálculo del tiempo de generación por recuentos viables

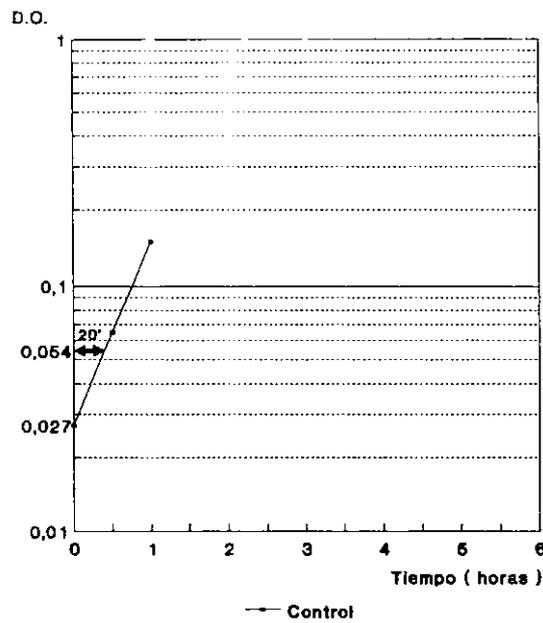


Figura 24.- Cálculo del tiempo de generación por fotometría midiendo el tiempo que tarda en duplicarse la densidad óptica del cultivo

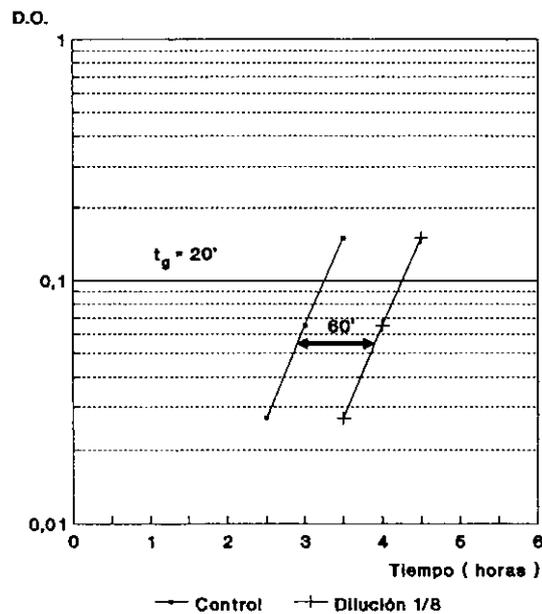


Figura 25.- Cálculo del tiempo de generación por espectrofotometría

### 3.2.4.12. RELACION D.O. (ABSORBANCIA) - RECUENTOS VIABLES

Como hemos expuesto anteriormente, el seguimiento del ciclo de crecimiento de un cultivo bacteriano se puede realizar por múltiples métodos. El que nosotros proponemos es el método espectrofotométrico, midiendo los cambios de la densidad óptica con respecto al tiempo de los cultivos bacterianos en medio líquido.

Si paralelamente al seguimiento espectrofotométrico del cultivo bacteriano se realiza un seguimiento por recuentos viables en placa, se obtiene una curva Densidad Óptica ( DO ) - recuentos viables/ml , igual a la que aparece expresada en forma logarítmica en la Figura 26.

Para configurar la curva Densidad Óptica (D.O.) - Concentración bacteriana de la Figura 26, se realizaron 4 experiencias con *Escherichia coli* ATCC 25922 en las que se medía cada 30 min. la densidad óptica de la suspensión y se hacía el recuento viable en agar por triplicado desde  $T_0$  hasta  $T_7$ . Se consideró  $T_0$  cuando el cultivo alcanzó una absorbancia de 0,1 que se corresponde con un inóculo bacteriano de  $4-5 \times 10^7$ , en ese momento fue diluído 1000 veces y se procedió a realizar periódicamente las lecturas, siendo a partir de una concentración bacteriana de  $10^6$  UFC/ml cuando se apreciaba un cambio de la D.O. de la suspensión, cambio que era directamente proporcional a la concentración bacteriana hasta que ésta llegaba a  $3 \times 10^8$  UFC/ml, punto a partir del cual el incremento de los recuentos se correspondía con un débil aumento de la densidad óptica del cultivo.

## Escherichia coli

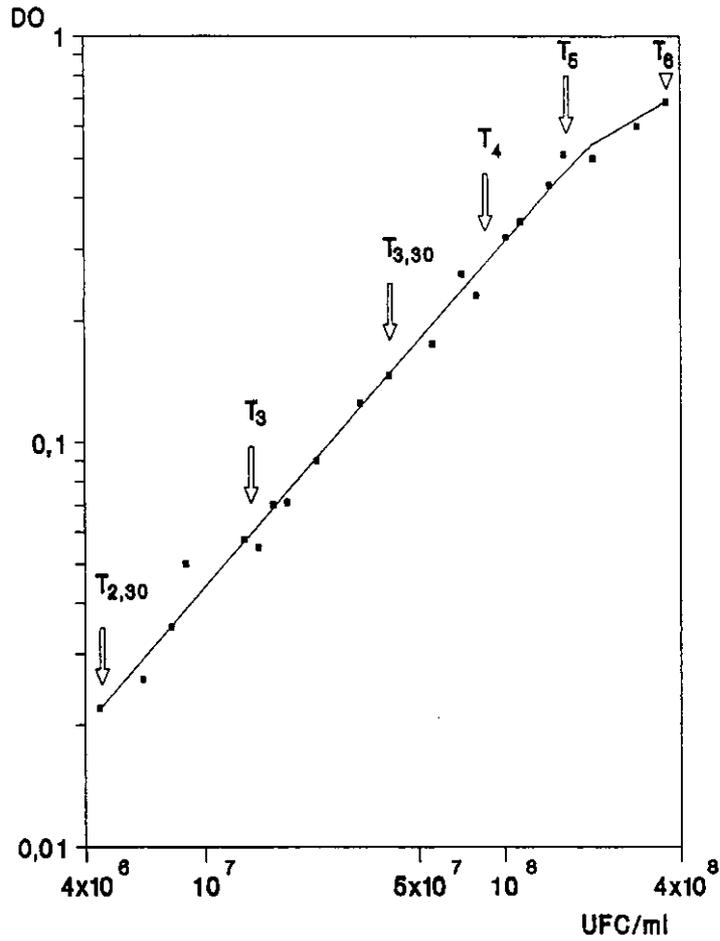
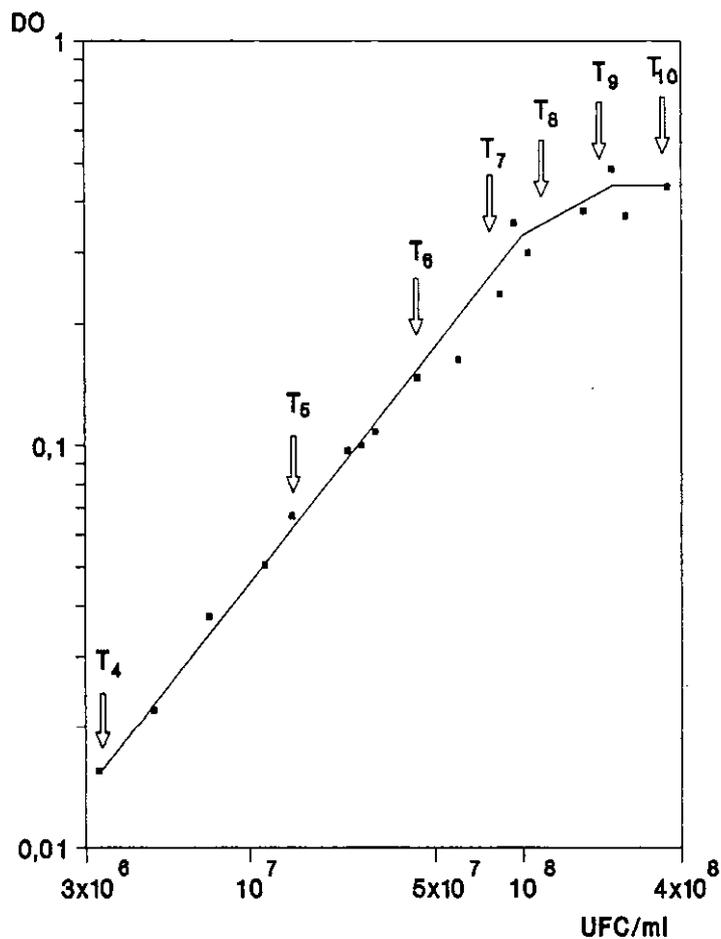


Figura 26.- Densidad óptica ( DO ) como una función de la concentración celular bacteriana ( UFC/ml ). Validación de la linealidad de la espectrofotometría respecto a los recuentos viables en *Escherichia coli* ATCC 25922

De igual modo realizamos la curva de calibración de *P.aeruginosa* ATCC 27853 ( Figura 27 ). La linealidad de la espectrofotometría y los recuentos viables se mantiene en este caso hasta una densidad óptica de 0,3 equivalente a  $10^8$  UFC/ml. A partir de este punto se rompe, incrementándose más los recuentos que la densidad óptica de la suspensión.

### *Pseudomonas aeruginosa*



**Figura 27.-** Densidad óptica ( DO ) como una función de la concentración celular bacteriana ( UFC/ml ). Validación de la linealidad de la espectrofotometría respecto a los recuentos viables en *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

En la curva de calibración de *S.aureus* ATCC 29213 ( Figura 28 ), el aumento de la densidad óptica es proporcional al aumento del número de UFC/ml desde una concentración celular bacteriana de  $4 \times 10^6$  ( límite inferior a partir del cual el espectrofotómetro, a una longitud de onda de 450 nm y en las condiciones estándares establecidas, comienza a detectar crecimiento bacteriano ) hasta  $6-7 \times 10^7$  UFC/ml, equivalente a una D.O. de 0,5. Por encima de esta concentración bacteriana el aumento de la misma se corresponde con débiles incrementos de la D.O., lo que corresponde en la Figura 28 a los puntos de la zona superior derecha.

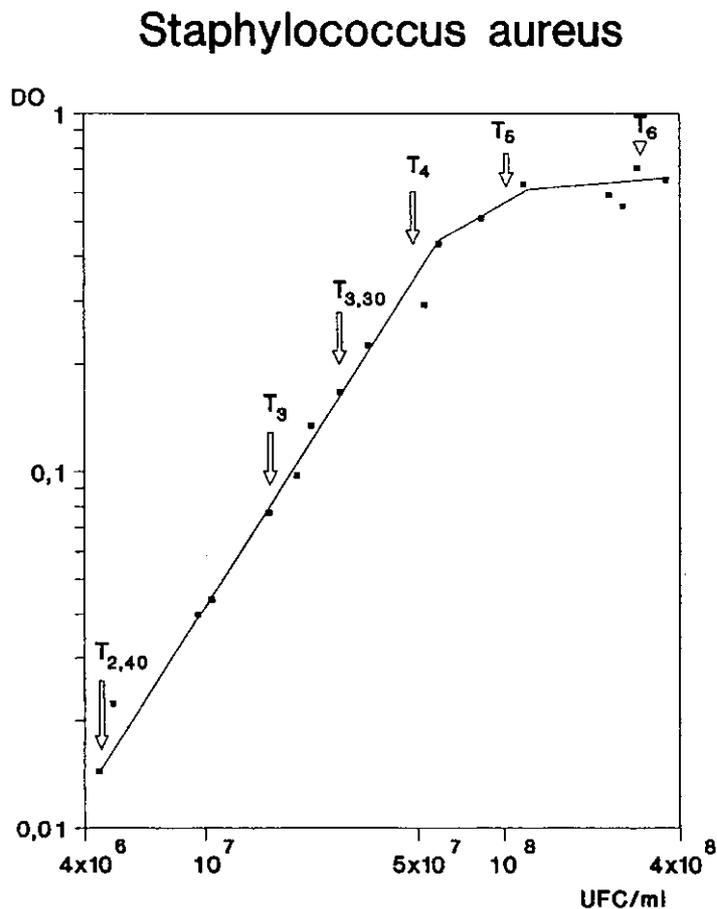


Figura 28.- Densidad óptica ( DO ) como una función de la concentración celular bacteriana ( UFC/ml ). Validación de la linealidad de la espectrofotometría respecto a los recuentos viables en *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

### 3.2.4.13.DETERMINACION DEL EPA POR RECuentOS VIABLES

Para determinar el EPA por recuentos viables, se usó la técnica descrita hasta la monitorización del crecimiento bacteriano. Los recuentos viables del cultivo control y tratado se verifican cada hora hasta que la suspensión alcanza una turbidez considerable. Estos recuentos se obtienen por triplicado depositando y extendiendo 100  $\mu$ l de dos diluciones en base 10 ( en solución salina ) en las placas de agar Mueller-Hinton. Después se incuban las placas durante 18-24 hs a 35°C y se procede al contaje del número de Unidades Formadoras de Colonias ( UFC ). El resultado se expresa por mililitro ( UFC/ml ).

El EPA se calcula según la fórmula:

$$\text{EPA} = T - C \quad (1)$$

donde EPA, es el efecto postantibiótico; T, el tiempo requerido por los microorganismos expuestos al antimicrobiano para incrementar su población 10 veces frente a la que existía en el medio tras la eliminación del fármaco y C, es el tiempo requerido por el control ( no expuesto ) para aumentar su población 10 veces respecto a la observada tras la dilución.

### 3.2.4.14.COMPARACION METODO CLASICO Y METODO ESPECTROFOTOMETRICO

Para comparar ambos métodos se usaron las cepas patrones: *Escherichia coli* ATCC 25922; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* 29213 y los antibióticos: gentamicina; ciprofloxacino; ceftriaxona; imipenem (con *E.coli* y *P.aeruginosa*) y piperacilina ( sólo con *E.coli* ). Se utilizó el test de significación estadística de la t de Student para datos apareados.

#### 3.2.4.15. EFICACIA DEL METODO DE DILUCION PARA LA ELIMINACION DEL ANTIBIOTICO

Para comprobar que la dilución  $10^{-3}$  era suficiente para eliminar el antibiótico del medio de cultivo, de forma que no influyera en la cinética de crecimiento de la bacteria medida por espectrofotometría, se mezcló cada antibiótico a una concentración de  $0,008 \times$  CMI con 10 ml del cultivo control de *E.coli* ATCC 25922 ; *P.aeruginosa* ATCC 27853 y *S.aureus* ATCC 29213. Se utilizó pues una dilución  $10^{-3}$  de una concentración de antibiótico superior a la que se usaría en los experimentos comprobando que, en todos los casos, las curvas de crecimiento del cultivo sin y con antibiótico son paralelas. Si existiese concentraciones residuales de antimicrobiano ambas curvas no serían paralelas.

#### 3.2.4.16. INFLUENCIA DE LA DILUCION SOBRE LA CINETICA DE CRECIMIENTO

Para confirmar que la dilución  $10^{-3}$  de los cultivos, realizada para eliminar el antibiótico, no producía ningún retraso en el crecimiento logarítmico normal de bacteria que originara efectos postantibióticos erróneos se realizó, en una experiencia con *E.coli* ATCC 25922, una monitorización espectrofotométrica del cultivo bacteriano antes de ser sometido a la dilución  $10^{-3}$  y del cultivo sujeto a dicha dilución. Se comprobó que la curva D.O.-tiempo de ambos estaba separada en el tiempo tantos  $t_g$  ( 9,966 ) como correspondía a la dilución efectuada ( Figura 29 ). Se concluyó por tanto, que no existía ninguna fase de retraso en el crecimiento de la bacteria producida por la dilución. El  $t_g$  de la bacteria antes y después de la dilución  $10^{-3}$  era el mismo e igual a 20 minutos.

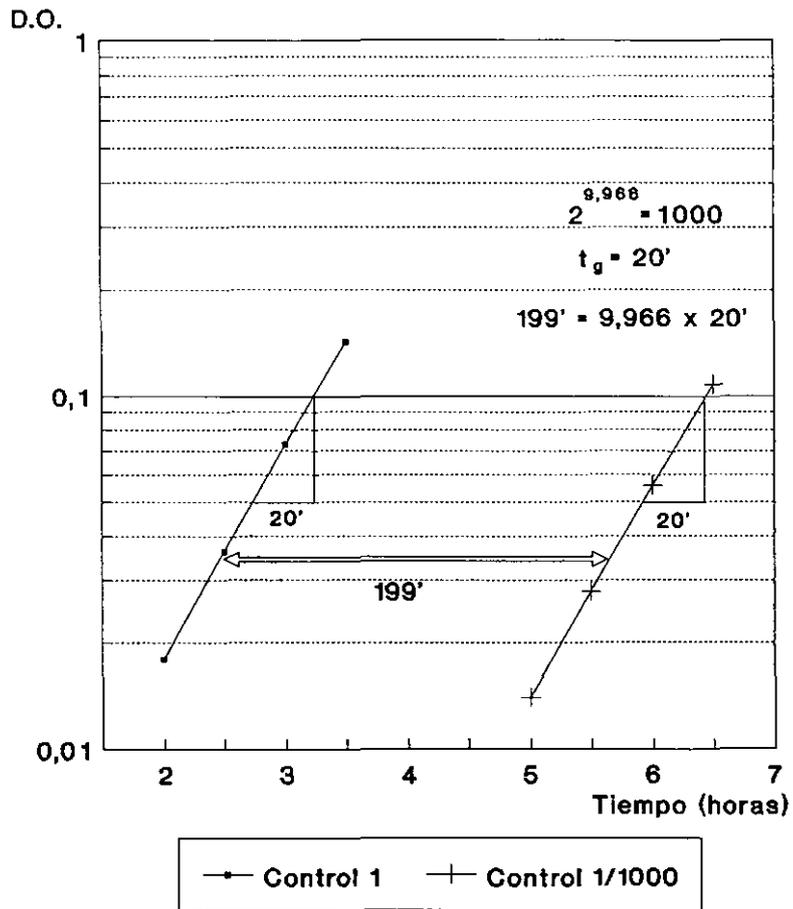


Figura 29.-Monitorización espectrofotométrica de un cultivo bacteriano antes de ser sometido a la dilución  $10^3$  y del cultivo sujeto a dicha dilución.

## RESULTADOS

#### 4.- RESULTADOS

##### 4.1. CMI

Las CMIs obtenidas por el método de dilución en caldo ( **Tabla I** ) se encuentran en el mismo punto  $\pm$  una dilución de las obtenidas por dilución en agar ( **Tabla II** ), salvo en el caso de gentamicina con *Pseudomonas aeruginosa* 251 y 276 en las que la diferencia fue de dos diluciones por debajo.

Las CMIs de las cepas de referencia se encuentran dentro del rango de CMIs indicadas por el NCCLS en 1990, con excepción de la CMI reportada por el método de dilución en caldo de *P.aeruginosa* ATCC 27853 frente a gentamicina, la cual se halla una dilución por debajo del rango anteriormente mencionado.

Para la determinación del efecto postantibiótico hemos elegido en cada caso la CMI lograda por dilución en caldo ya que es en este mismo medio donde se realiza el cálculo del EPA.

TABLA I.- Concentraciones mínimas inhibitorias en  $\mu\text{g/ml}$  obtenidas por dilución en caldo.

	Gentamicina	Ciprofloxacino	Ceftriaxona	Imipenem
<i>E.coli</i> ATCC 25922	0,5	0,007	0,12	0,12
<i>E.coli</i> 304	0,25	0,007	0,06	0,12
<i>E.coli</i> 347	0,5	0,007	0,03	0,12
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	0,5	0,25	8	2
<i>P.aeruginosa</i> 251	0,25	0,06	16	2
<i>P.aeruginosa</i> 276	0,25	0,06	16	2
<i>S.aureus</i> ATCC 29213	0,25	0,25	4	0,03
<i>S.aureus</i> 356	0,12	0,25	2	0,03
<i>S.aureus</i> 360	0,25	0,25	2	0,03

TABLA II.- Concentraciones mínimas inhibitorias en  $\mu\text{g/ml}$  obtenidas por dilución en agar.

	Gentamicina	Ciprofloxacino	Ceftriaxona	Imipenem
<i>E.coli</i> ATCC 25922	0,5	0,007	0,06	0,12
<i>E.coli</i> 304	0,25	0,007	0,03	0,12
<i>E.coli</i> 347	0,5	0,007	0,015	0,12
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	1	0,12	8	2
<i>P.aeruginosa</i> 251	1	0,03	16	2
<i>P.aeruginosa</i> 276	1	0,06	16	2
<i>S.aureus</i> ATCC 29213	0,25	0 12	2	0,03
<i>S.aureus</i> 356	0,12	0,12	2	0,03
<i>S.aureus</i> 360	0,25	0,25	2	0,03

## 4.2. ENSAYOS CON ESCHERICHIA COLI

### 4.2.1. ESCHERICHIA COLI ATCC 25922 : VALIDACION DEL CALCULO ESPECTROFOTOMETRICO DEL EPA

#### 4.2.1.1. CALCULO DEL TIEMPO DE GENERACION

La Figura 30 muestra el cálculo del tiempo de generación de esta cepa patrón utilizando la técnica espectrofotométrica. El tiempo de generación fue de 20 minutos.

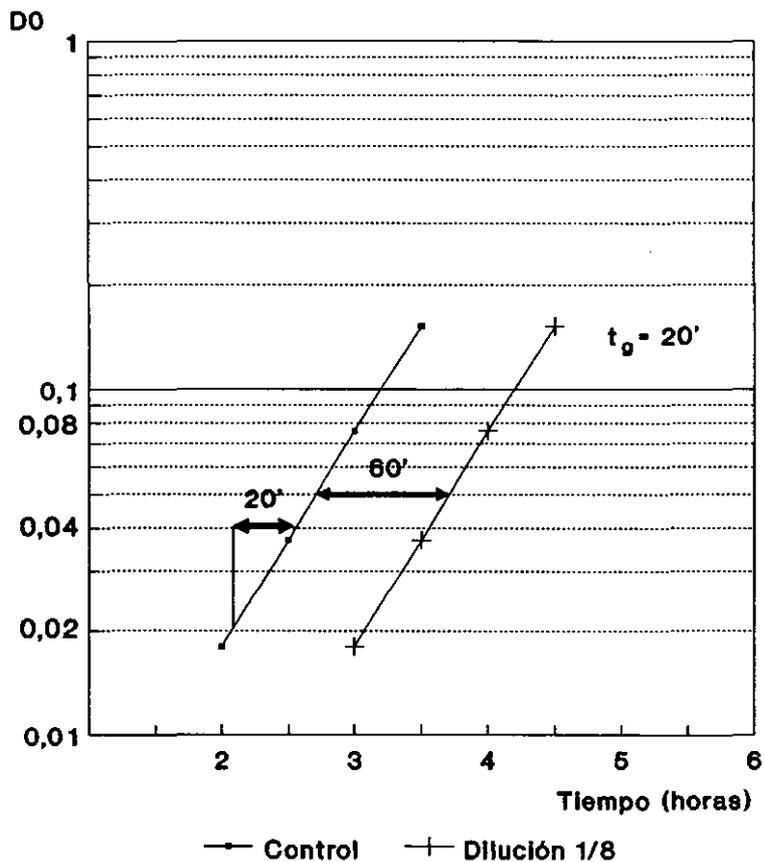


Figura 30.- Curvas de crecimiento logarítmico de un cultivo de *E. coli* ATCC 25922 y del mismo cultivo diluido 1/8.

#### 4.2.1.2. E.COLI ATCC 25922 - GENTAMICINA : ENSAYOS DE VALIDACION

La exposición de un cultivo de *Escherichia coli* ATCC 25922 de densidad bacteriana media  $4,7 \times 10^7$  UFC/ml en fase logarítmica de crecimiento durante una hora a  $2 \mu\text{g/ml}$  ( 4x CMI ) de gentamicina deparó un descenso en el inóculo de  $0,88 \log_{10}$  UFC/ml ( media de 4 experimentos: **Tabla III** ). Concentraciones de  $0,5$  y  $1 \mu\text{g/ml}$  ( 1x y 2x CMI respectivamente ) tuvieron actividad bacteriostática ya que seguía existiendo crecimiento bacteriano aunque a una velocidad reducida ( efecto bactericida =  $r < 1$  ).

Como la actividad antibacteriana de los antibióticos aminoglucósidos es proporcional a la concentración antimicrobiana ( Craig et al., 1988 ), este efecto podría ser debido a que la CMI calculada con un inóculo estándar de  $5 \times 10^5$  UFC/ml es inferior a la que se puede obtener con  $4,7 \times 10^7$  UFC/ml, inóculo medio utilizado en esta experiencia.

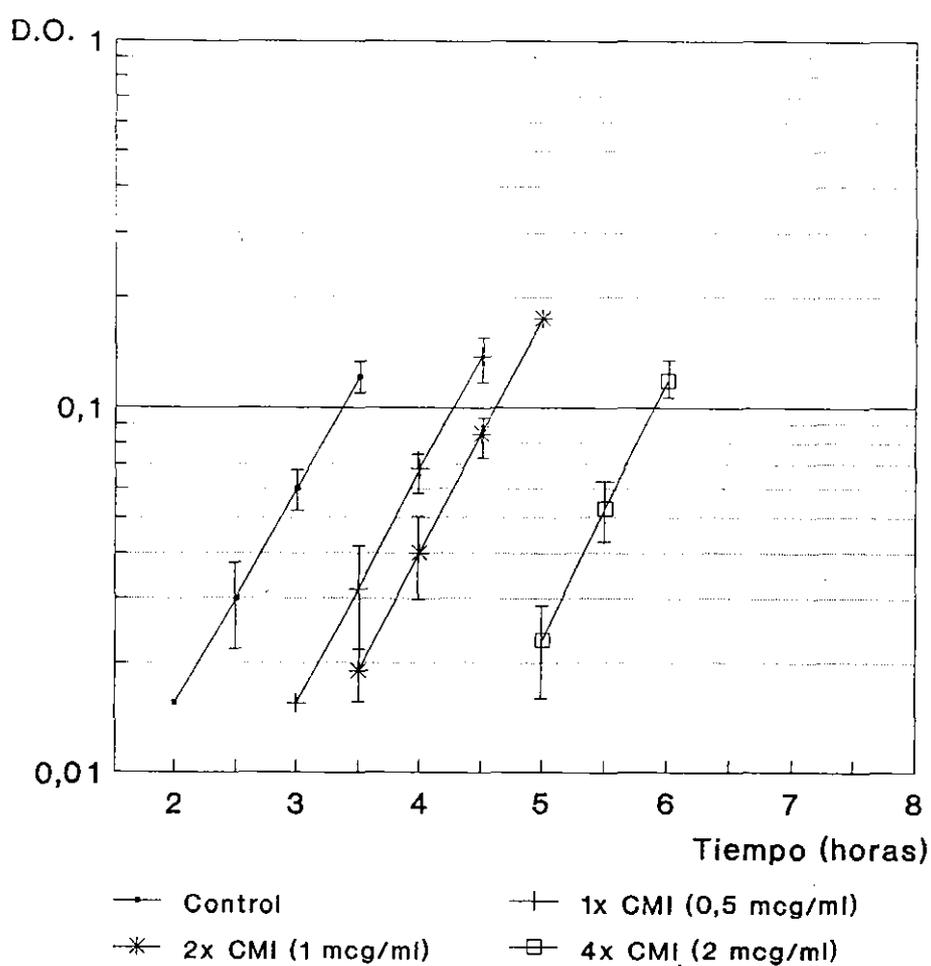
La **Figura 31** nos muestra el aumento de la densidad óptica respecto al tiempo del cultivo control y los expuestos a 1x, 2x y 4x CMI de gentamicina, trazando así la curva de crecimiento de cada uno de ellos.

La **Figura 32** representa el EPA obtenido por espectrofotometría a las distintas concentraciones de antibiótico ensayadas. El EPA aumenta conforme lo hace la concentración del antibiótico ( **Tabla III** ), llegando a tener una duración de 1,13 horas con  $2 \mu\text{g/ml}$  ( 4x CMI ).

Los datos en ambas figuras están representados con la media de 4 ensayos. Las barras verticales expresan la desviación estándar.

El EPA obtenido en esta misma combinación droga-microorganismo siguiendo el método de recuentos viables en placa fue de  $0,52 \pm 0,14$  hs con 1x CMI ;  $0,65 \pm 0,12$  hs con 2x CMI y  $1,05 \pm 0,04$  hs con 4x CMI ( **Tabla III** ), valores representados en la **Figura 33** por la media  $\pm$  la desviación estándar de 4 ensayos.

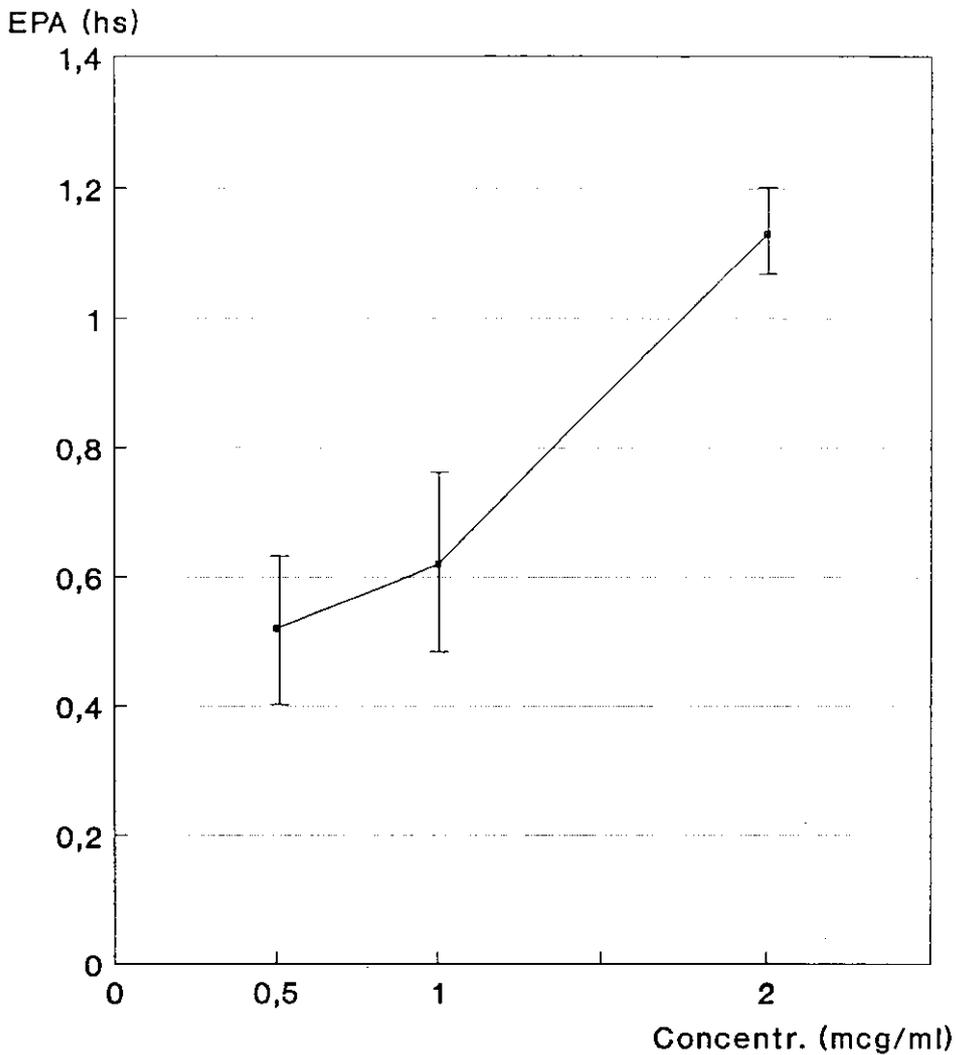
## E.coli ATCC 25922- Gentamicina



Curva densidad óptica-tiempo

Figura 31.- Cinética de crecimiento, monitorizada por espectrofotometría, de *Escherichia coli* ATCC 25922 tras una hora de exposición a distintas concentraciones de gentamicina. Datos presentados con la media  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales) de 4 experiencias.

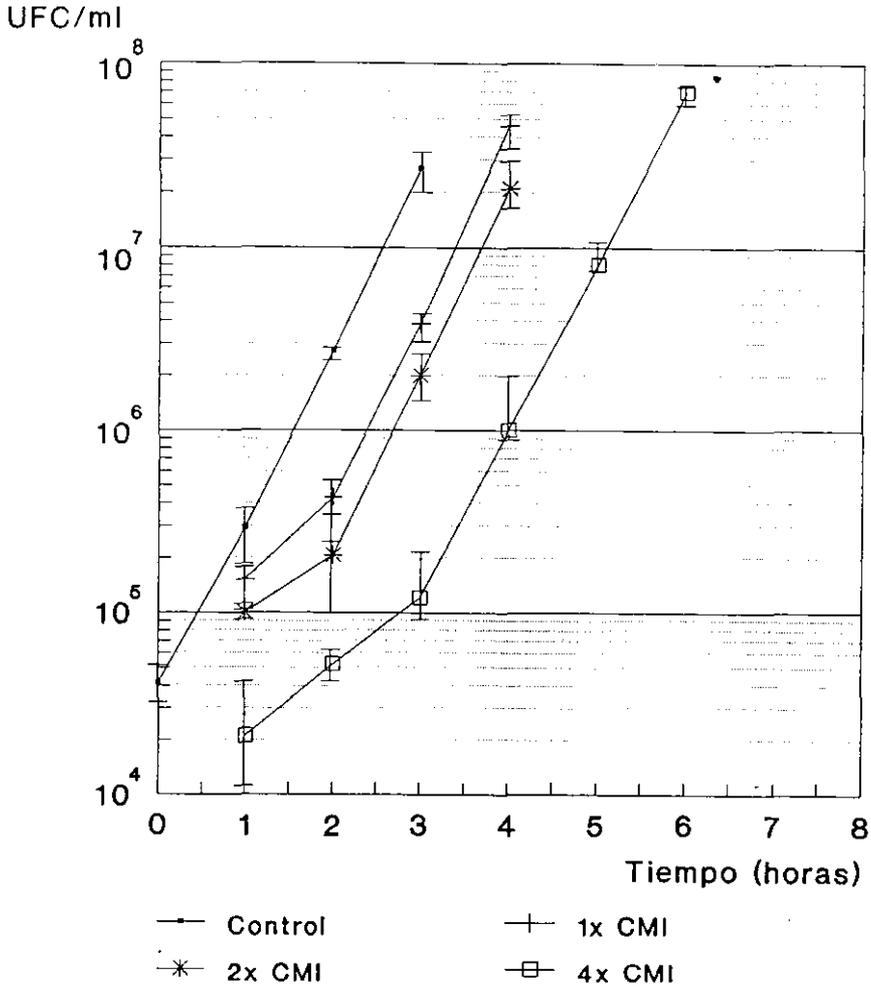
## E.coli ATCC 25922- Gentamicina



Curva EPA-concentración antimicrobiana

Figura 32.- Efecto de la concentración de gentamicina sobre la duración del EPA. Datos presentados con la media  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales) de 4 experiencias.

### E.coli ATCC 25922- Gentamicina



Curva recuentos bacterianos-tiempo

Figura 33.- Cinética de crecimiento, monitorizada por recuentos viables, de *Escherichia coli* ATCC 25922 tras una hora de exposición a distintas concentraciones de gentamicina. Datos presentados con la media  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales) de 4 experiencias.

#### 4.2.1.3. E.COLI ATCC 25922 - CIPROFLOXACINO : ENSAYOS DE VALIDACION

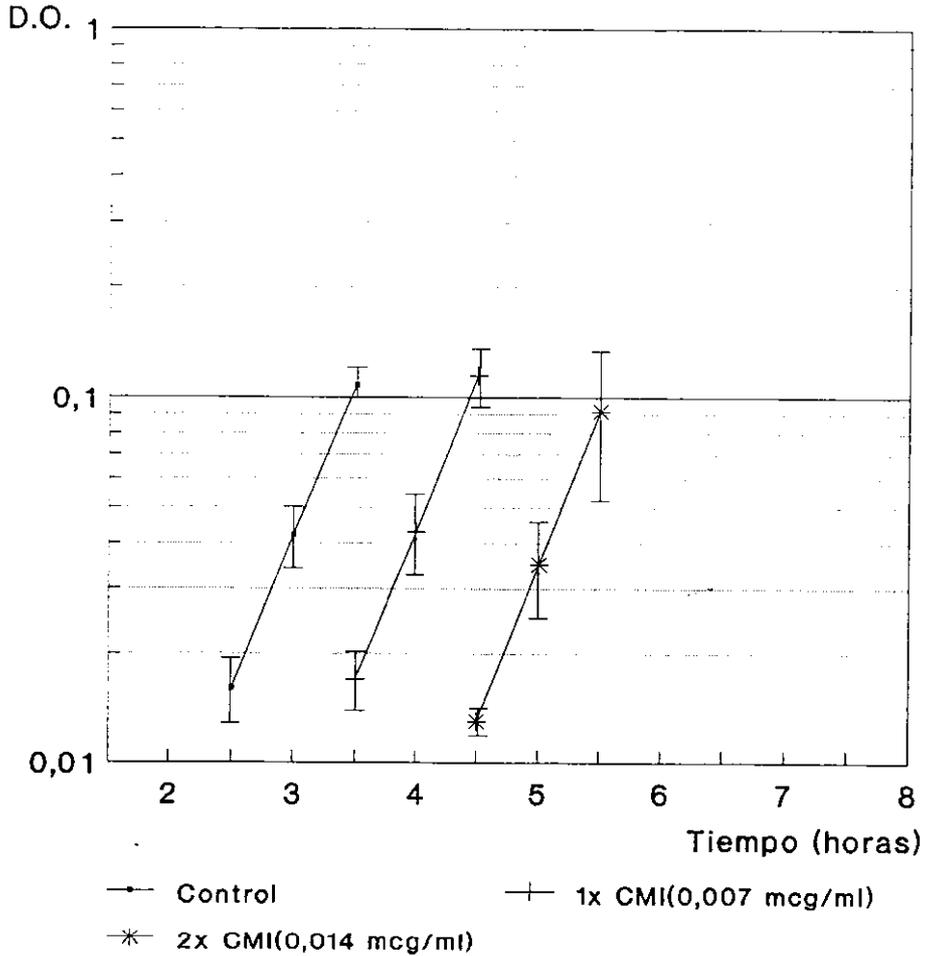
La actividad bactericida de ciprofloxacino cuando se puso en contacto durante una hora con cultivos puros de *Escherichia coli* ATCC 25922 a una densidad celular media de  $3,4 \times 10^7$  UFC/ml era concentración dependiente, siendo el descenso medio obtenido de 5 experimentos de  $0,04 \log_{10}$  UFC/ml para 1x CMI y de  $0,77 \log_{10}$  UFC/ml para 2x CMI ( Tabla III ). Concentraciones superiores a esta última ( 4x y 8x CMI ) mostraban una actividad bactericida intensa, con descensos en el inóculo inicial de  $2,67 \pm 0,02 \log_{10}$  UFC/ml con 4x CMI y de  $3,2 \pm 0,6 \log_{10}$  UFC/ml con 8x CMI, motivo por el cual optamos por ensayar sólo las concentraciones 1 y 2x CMI.

La Figura 34 nos muestra las modificaciones de la D.O. de cada cultivo respecto al tiempo configurando su curva de crecimiento.

El EPA de ciprofloxacino frente a *E.coli* ATCC 25922 es también dosis dependiente siendo su duración media con 1x CMI (  $0,007 \mu\text{g/ml}$  ) de 0,14 horas y con 2x CMI (  $0,015 \mu\text{g/ml}$  ) de 0,41 hs ( Tabla III ). La Figura 35 nos muestra el EPA como función de la concentración antimicrobiana de ciprofloxacino frente a *E.coli* ATCC 25922.

La representación gráfica del crecimiento bacteriano monitorizado por recuentos viables aparece reflejada en la Figura 36. El EPA calculado por esta técnica fue de  $0,18 \pm 0,12$  hs para 1x CMI y de  $0,42 \pm 0,12$  hs para 2x CMI ( Tabla III ).

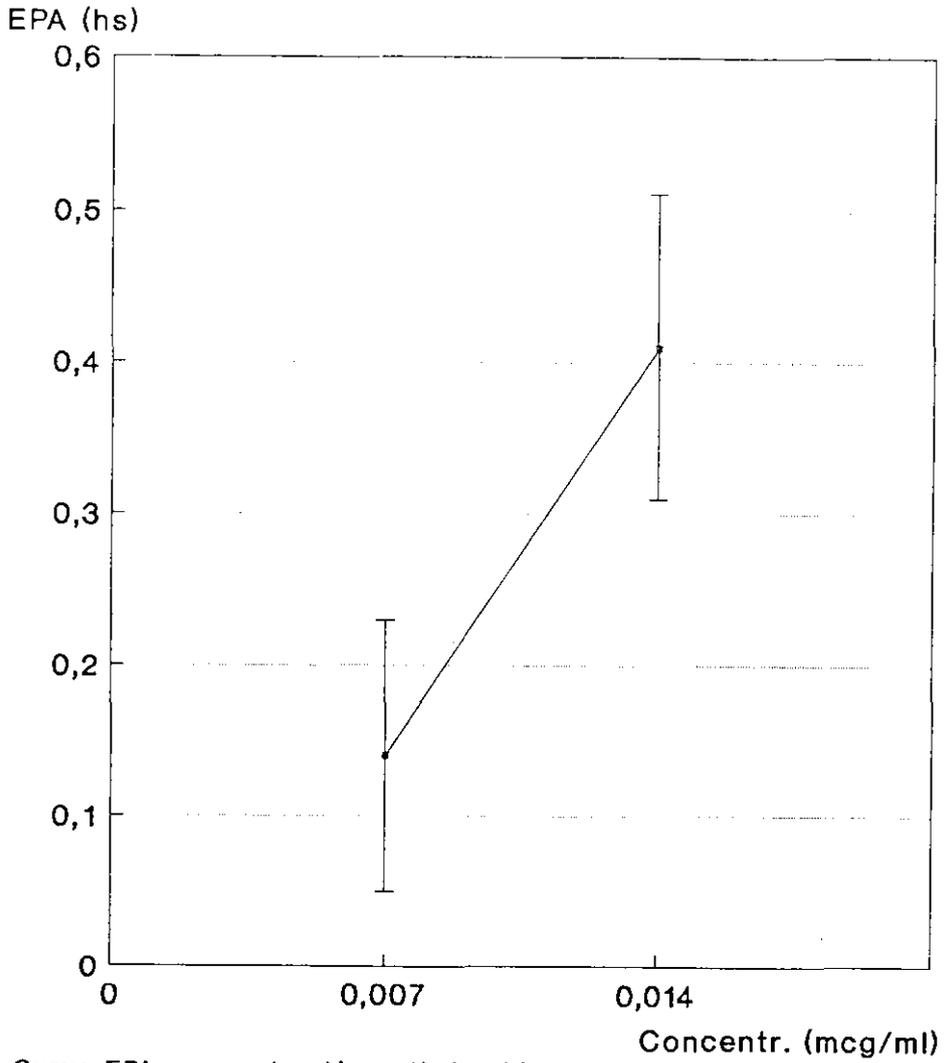
### E.coli ATCC 25922- Ciprofloxacino



Curva densidad óptica-tiempo

Figura 34.- Cinética de crecimiento, monitorizada por espectrofotometría, de *Escherichia coli* ATCC 25922 tras una hora de exposición a distintas concentraciones de ciprofloxacino. Datos presentados con la media  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales) de 5 experiencias.

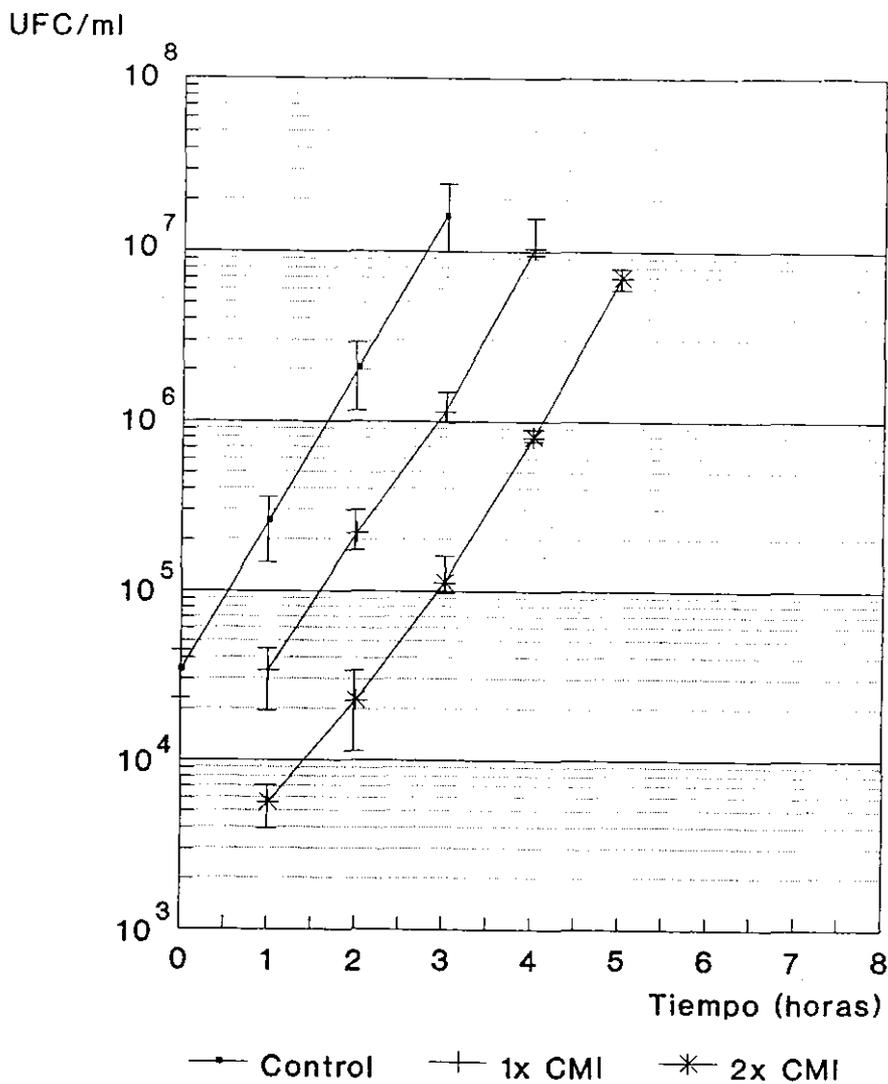
### E.coli ATCC 25922- Ciprofloxacino



Curva EPA-concentración antimicrobiana

Figura 35.- Efecto de la concentración de ciprofloxacino sobre la duración del EPA. Datos presentados con la media  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales) de 5 experiencias.

## E.coli ATCC 25922-Ciprofloxacino



Curva recuentos bacterianos-tiempo

Figura 36.- Cinética de crecimiento, monitorizada por recuentos viables, de *Escherichia coli* ATCC 25922 tras una hora de exposición a distintas concentraciones de ciprofloxacino. Datos presentados con la media  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales) de 5 experiencias.

#### 4.2.1.4. E.COLI ATCC 25922 - CEFTRIAXONA : ENSAYOS DE VALIDACION

Ceftriaxona mostró una actividad bactericida importante cuando se puso en contacto durante una hora con *E.coli* ATCC 25922 a una densidad celular media de  $3,86 \times 10^7$  UFC/ml, provocando descensos en la población bacteriana de  $0,50 \pm 0,06 \log_{10}$  UFC/ml;  $0,52 \pm 0,14 \log_{10}$  UFC/ml y  $0,61 \pm 0,07 \log_{10}$  UFC/ml con 1, 2 y 4x CMI respectivamente ( **Tabla III** ). Posteriormente se apreció un aumento desmesurado de las UFC/ml respecto al recuento inicial, efecto debido a la formación de filamentos y posterior división de los mismos en sus respectivos bacilos componentes (de tamaño normal) cuando cesa la acción del antibiótico.

Para controlar esta variable, se realizaron extensiones en porta del cultivo control y del expuesto durante una hora al antibiótico que luego se tiñeron con Giemsa ( **Figuras 37; 38; 39 y 40** ). Estas extensiones se examinaban al microscopio óptico y se obtenía el factor de corrección (Sección 3.2.4.6.), que luego multiplicábamos por el inóculo que se había obtenido por recuentos viables en agar.

De esta manera se realizaron 4 experiencias obteniendo un factor de corrección de  $1,46 \pm 0,1$  para el cultivo control;  $5,17 \pm 0,4$  para el cultivo expuesto a 1x CMI (  $0,12 \mu\text{g/ml}$  de ceftriaxona );  $5,54 \pm 0,3$  para 2x CMI y  $6,24 \pm 0,5$  para 4x CMI. Como se puede observar, al aumentar la concentración de antibiótico aumenta también el número medio de nucleos contenidos en cada filamento.

Utilizando estos factores de corrección se advirtió que no había habido reducción en el inóculo bacteriano expuesto a las tres concentraciones antibióticas ensayadas sino todo lo contrario, la población bacteriana había experimentado un aumento

tasado respecto al inóculo inicial en  $0,24 \pm 0,1 \log_{10}$  UFC/ml para 1x CMI;  $0,21 \pm 0,09 \log_{10}$  UFC/ml para 2x CMI y  $0,17 \pm 0,1$  para 4x CMI  $\log_{10}$  UFC/ml ( Tabla III ).



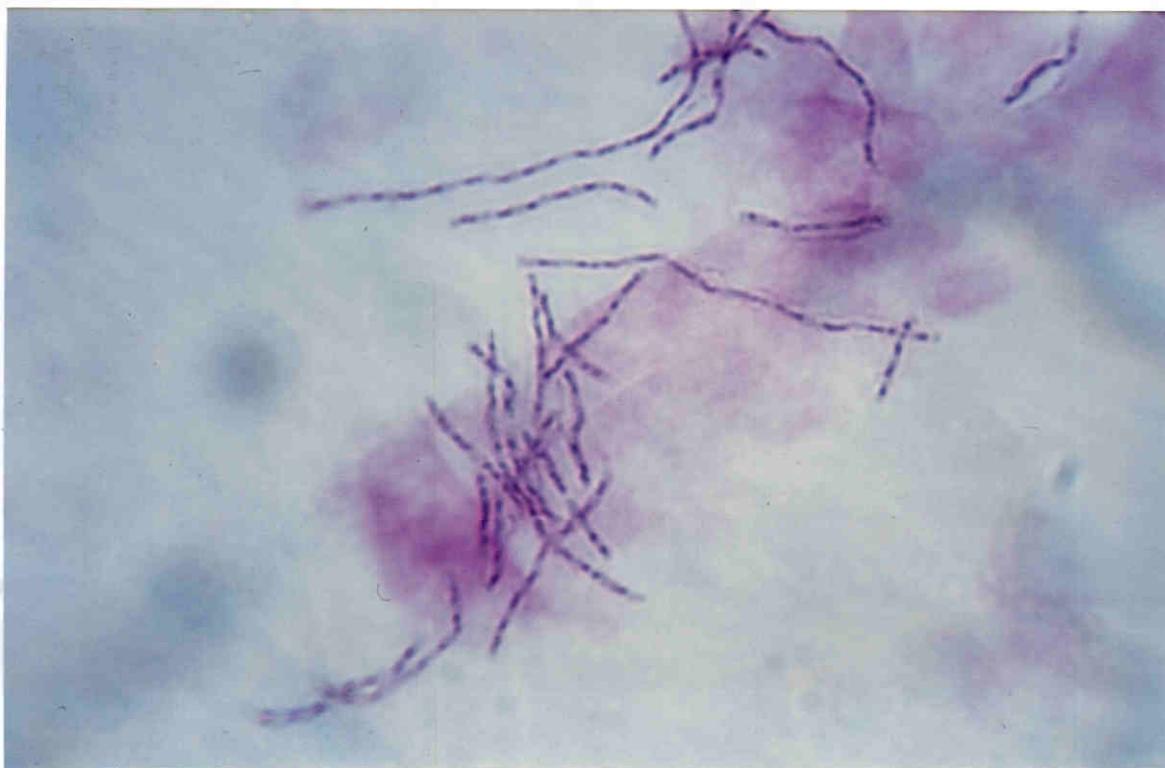
Figura 37.- Cultivo control de *E.coli* ATCC 25922 teñido con Giemsa ( x1000 aumentos )



**Figura 38.-** Filamentos de *E.coli* ATCC 25922 tras exposición a 1x CMI de ceftriaxona (0,12  $\mu\text{g/ml}$ ). Los puntos son ADN teñidos con Giemsa



**Figura 39.-** Filamentos de *E.coli* ATCC 25922 tras exposición a 2x CMI ( $0,25 \mu\text{g/ml}$ ) de ceftriaxona. Los puntos son ADN teñidos con Giemsa



**Figura 40.-** Filamentos de *E.coli* ATCC 25922 tras exposición a 4x CMI de ceftriaxona ( $0,5 \mu\text{g/ml}$ ). Los puntos son ADN teñidos con Giemsa

Cuando se representa la curva Densidad Optica-Tiempo ( Figura 41 ) del cultivo control y tratados, se observa que las curvas de crecimiento estaban separadas menos de una hora ( tiempo de exposición al antibiótico ), esto ratifica el hecho mencionado antes de la no existencia de lisis celular ( aumento del número real de genomas bacterianos aunque no del número de UFC) .

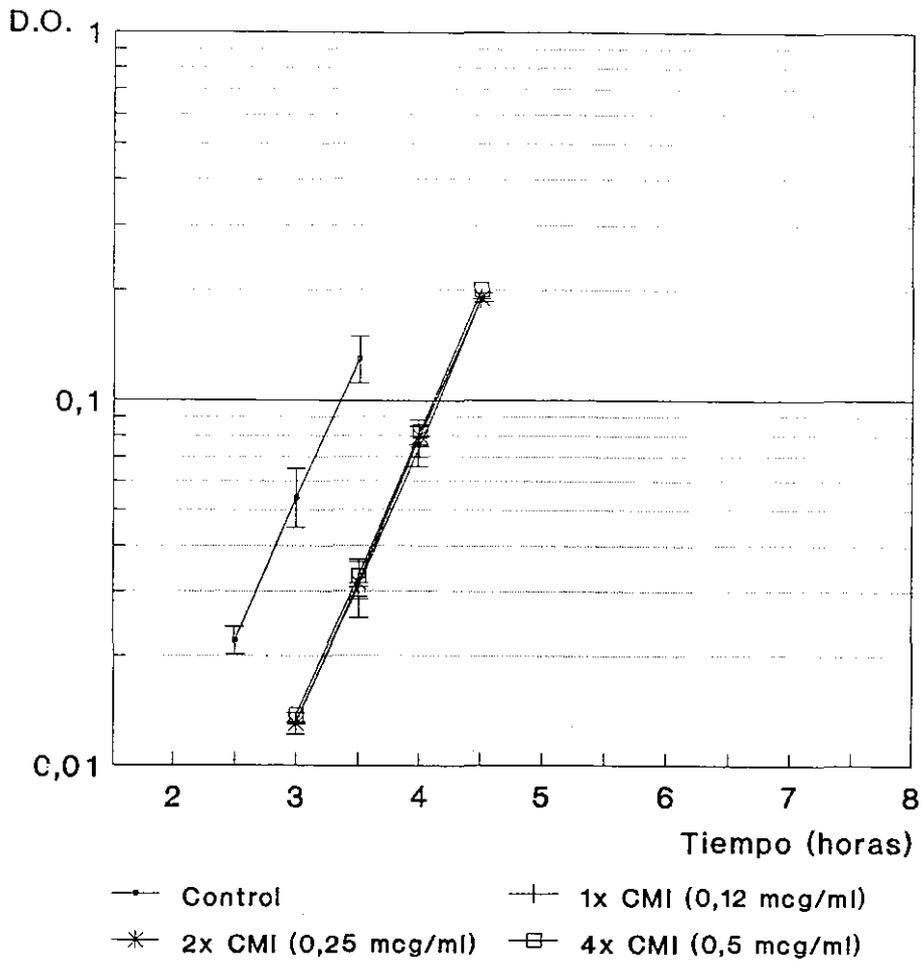
La separación existente entre la curva de crecimiento del cultivo control medida espectrofotométricamente y la de los cultivos tratados, era mayor conforme aumentaba la concentración de la droga añadida al cultivo, sin embargo, esta mayor separación era sólo de pocos minutos, lo que se traduce en una superposición práctica de las curvas de crecimiento de los cultivos expuestos a 1x, 2x y 4x CMI ( Figura 41 ) .

Si se utiliza los recuentos viables en placa sin corregir para calcular el efecto bactericida de este antibiótico, nos sale un EPA negativo disminuyendo su duración conforme aumenta la concentración de antibiótico añadida a la suspensión bacteriana desde  $-0,73 \pm 0,03$  hs con 1x CMI hasta  $-0,77 \pm 0,16$  hs y  $-0,91 \pm 0,08$  hs con 2 y 4x CMI respectivamente ( Tabla III ). Es lo que hemos denominado en la representación gráfica de la Figura 42 el EPA no corregido. Si rectificamos estos recuentos de la forma anteriormente mencionada, utilizando el factor calculado para enmendar la presencia de múltiples bacterias viables en una sólo UFC o filamento, obtenemos el EPA real ( Figura 42 ) que fue  $0 \pm 0,04$  horas para 1x CMI;  $0 \pm 0,02$  horas para 2x CMI y  $0,025 \pm 0,002$  horas para 4x CMI ( Tabla III ) .

La representación gráfica del aumento de los recuentos viables ( UFC/ml ) en el tiempo tanto del cultivo no expuesto (control) como de los tratados aparece reflejada en la Figura 43.

El cálculo del EPA por el método clásico sigue la misma suerte que el obtenido por fotometría, siendo negativo cuando se utilizan los recuentos sin más y nulo cuando se aplica la corrección en cada uno de ellos ( Tabla III ).

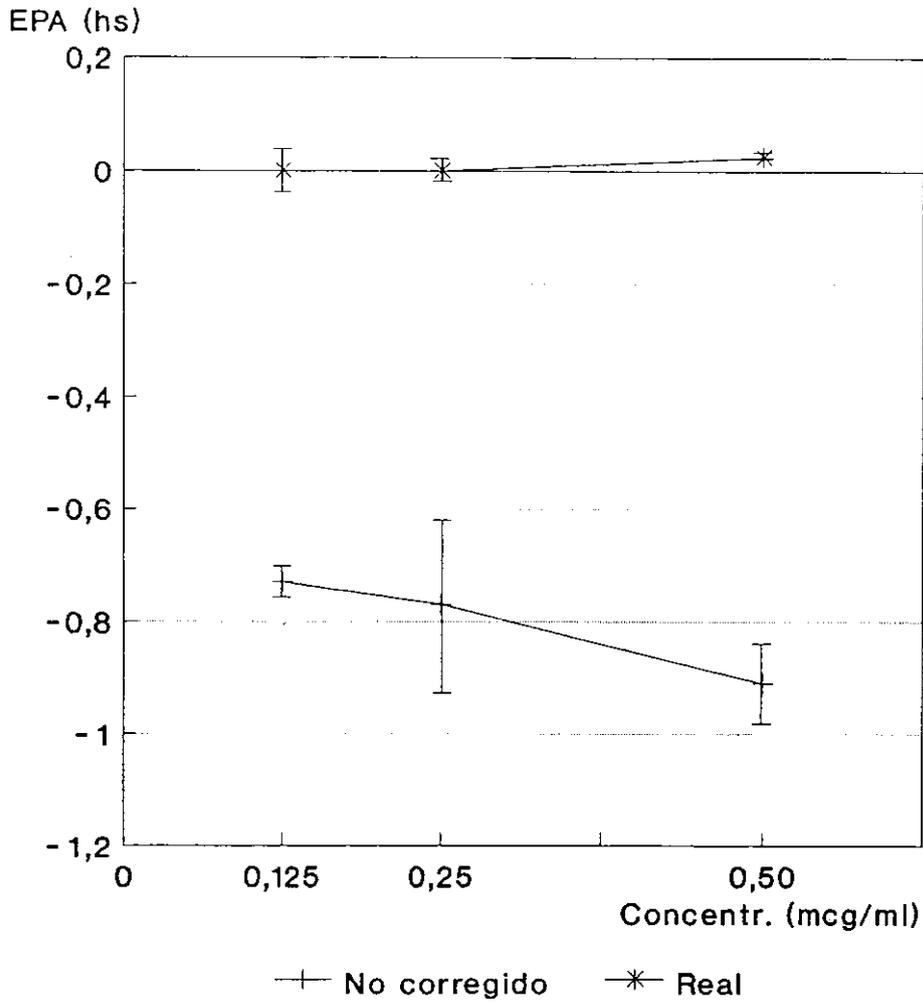
## E.coli ATCC 25922- Ceftriaxona



Curva densidad óptica-tiempo

Figura 41.- Cinética de crecimiento, monitorizada por espectrofotometría, de *Escherichia coli* ATCC 25922 tras una hora de exposición a distintas concentraciones de ceftriaxona. Datos presentados con la media  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales) de 4 experiencias.

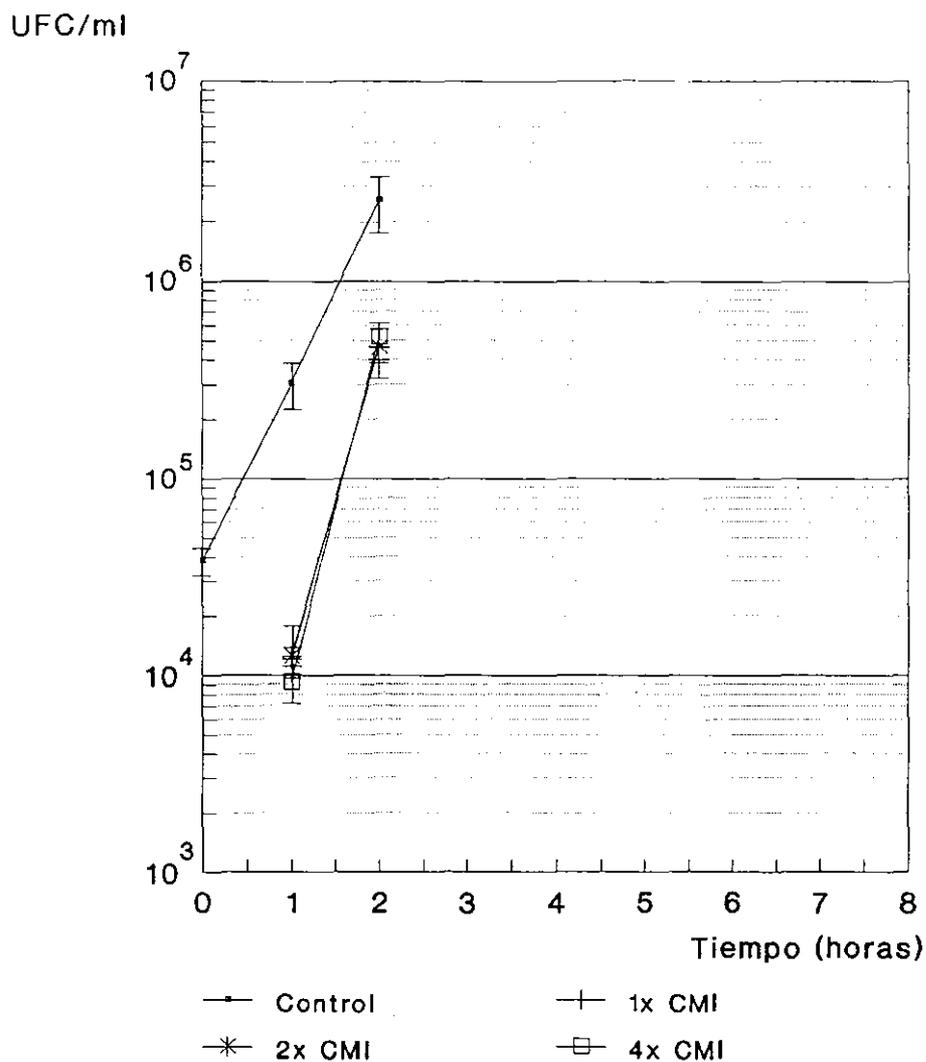
## E.coli ATCC 25922- Ceftriaxona



Curva EPA-concentración antimicrobiana

Figura 42.- Efecto de la concentración de ceftriaxona sobre la duración del EPA. Datos presentados con la media  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales) de 4 experiencias.

## E.coli ATCC 25922-Ceftriaxona



Curva recuentos bacterianos-tiempo

Figura 43.- Cinética de crecimiento, monitorizada por recuentos viables, de *Escherichia coli* ATCC 25922 tras una hora de exposición a distintas concentraciones de ceftriaxona. Datos presentados con la media  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales) de 4 experiencias.

## 4.2.1.5. E.COLI ATCC 25922 - PIPERACILINA :

## ENSAYOS DE VALIDACION

Para demostrar que el efecto multinucleo ocurría con otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos se ensayó piperacilina, una penicilina semisintética ( Selwyn, 1982 ) que también se une principalmente a la PBP 3, comprobando en los tres ensayos que se realizaron que ocurría lo mismo.

Así, el descenso en  $\log_{10}$  de UFC/ml sobre un inóculo medio de  $3,89 \times 10^7$  UFC/ml de *E.coli* ATCC 25922 calculado por recuentos bacterianos en agar, fue notable en las tres concentraciones ensayadas de piperacilina e igual a  $0,39 \pm 0,06 \log_{10}$  UFC/ml con 1x CMI;  $0,33 \pm 0,09 \log_{10}$  UFC/ml con 2x CMI y  $0,56 \pm 0,10 \log_{10}$  UFC/ml con 4x CMI ( Tabla III ). Los factores de corrección que se obtuvieron por visualización microscópica de las extensiones teñidas con Giemsa fueron de  $1,36 \pm 0,1$  para el control;  $5,63 \pm 0,1$  para 1x CMI;  $5,82 \pm 0,3$  para 2x CMI y  $7,88 \pm 0,4$  para 4x CMI. Estos factores aplicados a los recuentos bacterianos en placa deparaban un crecimiento bacteriano referenciado frente al inóculo inicial de  $0,26 \pm 0,02 \log_{10}$  UFC/ml en 1x CMI;  $0,24 \pm 0,06 \log_{10}$  UFC/ml en 2x CMI y de  $0,17 \pm 0,10 \log_{10}$  UFC/ml en 4x CMI ( Tabla III ).

La Figura 44 nos muestra la curva de crecimiento de *E.coli* ATCC 25922 monitorizada por espectrofotometría tras una hora de exposición a  $4 \mu\text{g/ml}$  ( 1x CMI ),  $8 \mu\text{g/ml}$  ( 2x CMI ) y  $16 \mu\text{g/ml}$  ( 4x CMI ) de piperacilina. Al igual que ocurría con ceftriaxona, las curvas de los cultivos tratados están superpuestas y separadas del control menos de una hora.

El EPA teórico ( no corregido ) era negativo, tanto más conforme aumenta la concentración del antibiótico en el cultivo

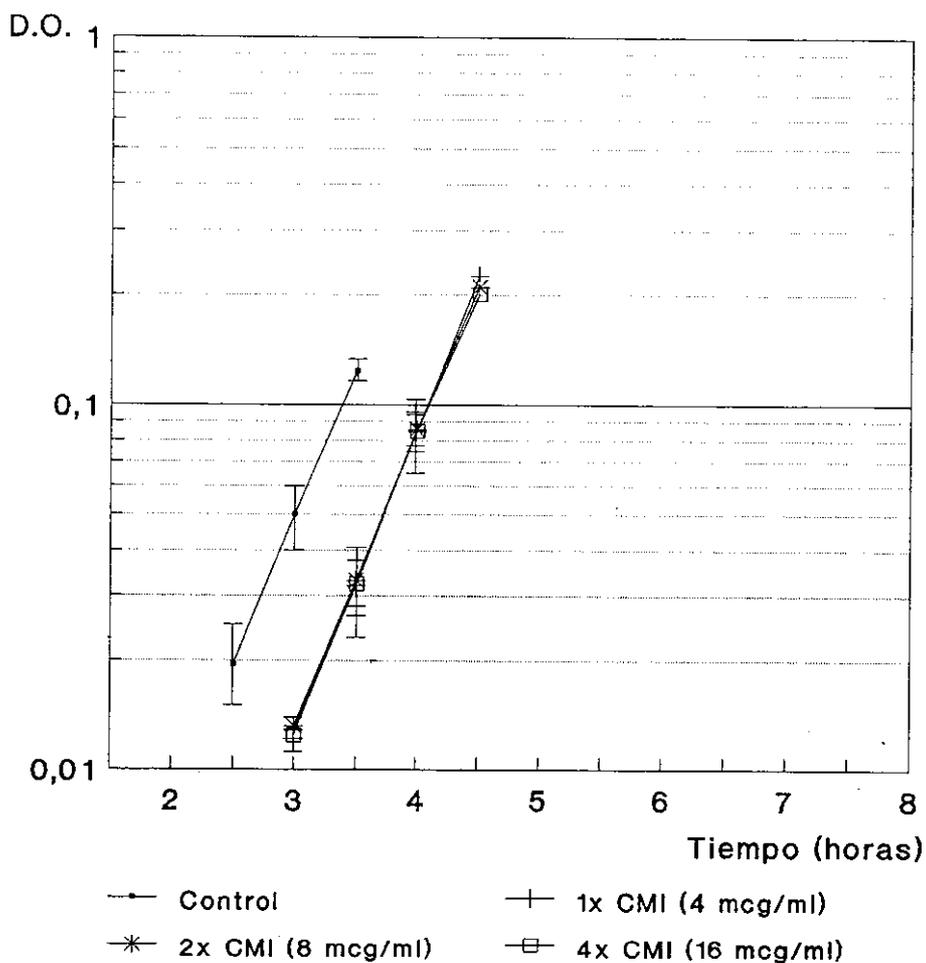
desde  $-0,57 \pm 0,04$  hs con 1x CMI hasta  $-0,61 \pm 0,10$  hs y  $-0,80 \pm 0,07$  hs con 2 y 4x CMI de piperacilina respectivamente ( **Tabla III** ). Su representación gráfica aparece en la **Figura 45**.

Una vez corregido el efecto multinúcleo, el EPA real ( **Figura 45** ) era de  $0,04 \pm 0,06$  hs para 1x CMI ;  $0,05 \pm 0,10$  hs para 2x CMI y  $0,02 \pm 0,00$  hs para 4x CMI ( **Tabla III** ).

La representación gráfica del incremento de los recuentos viables en el tiempo de los cultivos control y tratados aparece reflejada en la **Figura 46**.

La determinación del EPA por el método clásico se ve afectada por la formación de filamentos de la misma manera que lo hace la técnica espectrofotométrica ( **Tabla III** ).

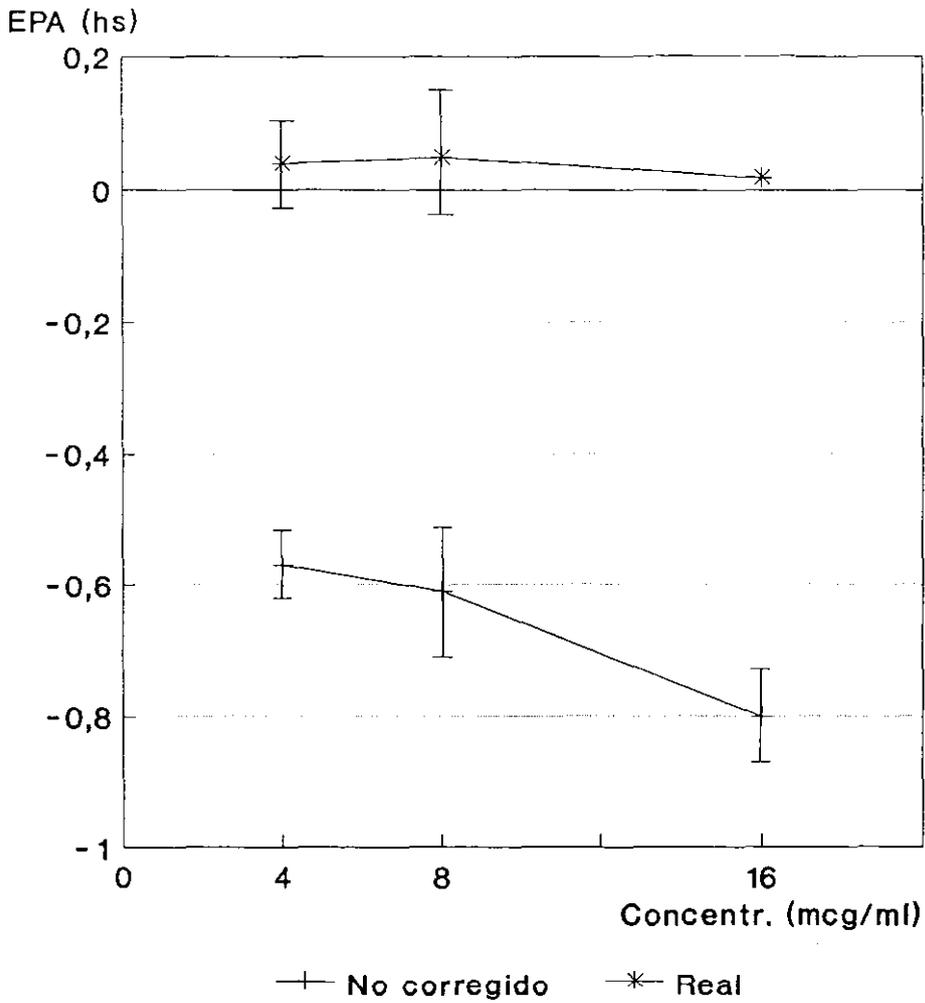
## E.coli ATCC 25922- Piperacilina



Curva densidad óptica-tiempo

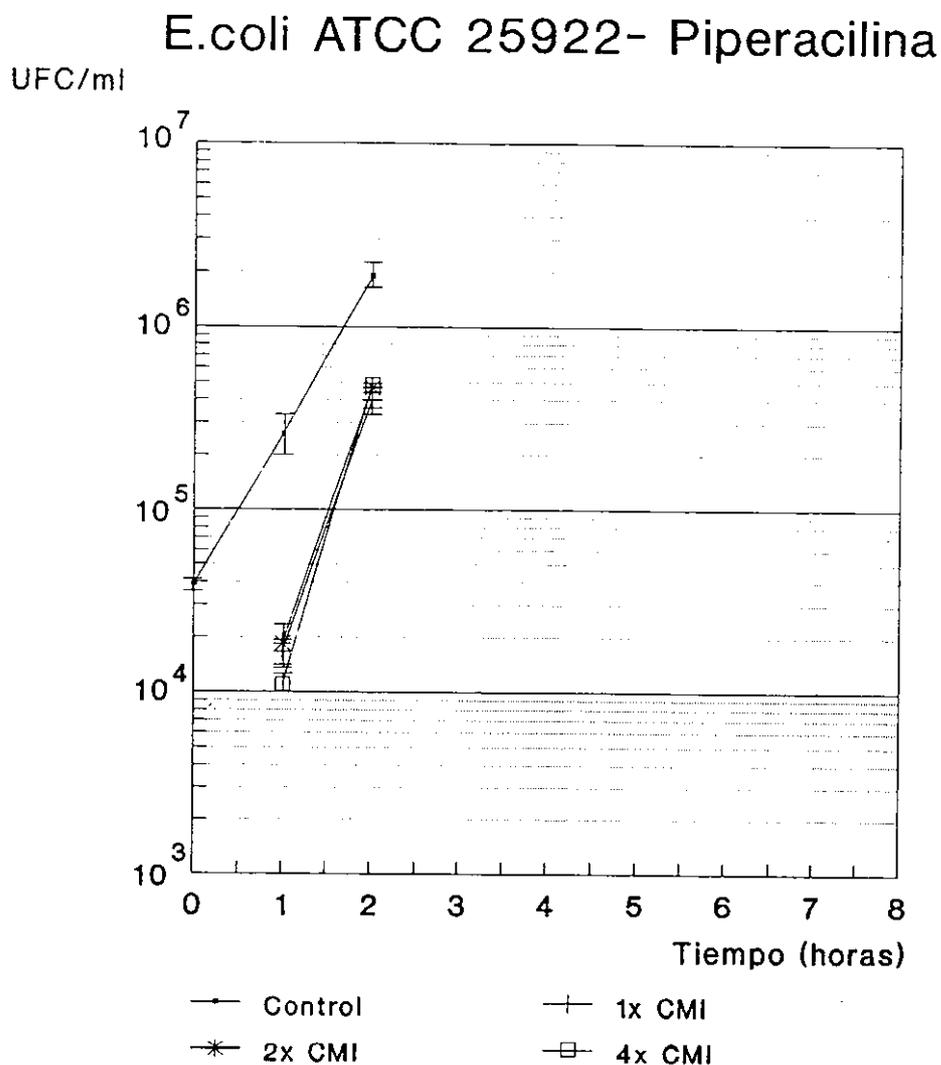
Figura 44.- Cinética de crecimiento, monitorizada por espectrofotometría, de *Escherichia coli* ATCC 25922 tras una hora de exposición a distintas concentraciones de piperacilina. Datos presentados con la media  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales) de 3 experiencias.

## E.coli ATCC 25922- Piperacilina



Curva EPA-concentración antimicrobiana

Figura 45.- Efecto de la concentración de piperacilina sobre la duración del EPA. Datos presentados con la media  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales) de 3 experiencias.



Curva recuentos bacterianos-tiempo

Figura 46.- Cinética de crecimiento, monitorizada por recuentos viables, de *Escherichia coli* ATCC 25922 tras una hora de exposición a distintas concentraciones de piperacilina. Datos presentados con la media  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales) de 3 experiencias.

4.2.1.6. E.COLI ATCC 25922 - IMIPENEM :  
ENSAYOS DE VALIDACION

Imipenem produce EPA sobre bacilos Gram negativos (Odenholt et al., 1989); ( Craig & Gudmundsson, 1991 ); ( Hanberger, 1992 ). Para validar la técnica espectrofotométrica de cálculo del EPA con imipenem se ensayó *E.coli* ATCC 25922 y 347 y *P.aeruginosa* ATCC 27853 y 276.

La exposición de un cultivo en fase logarítmica de crecimiento de *E.coli* ATCC 25922 con un inóculo de  $3,72 \times 10^7$  UFC/ml durante una hora a  $0,125 \mu\text{g/ml}$  ( 1x CMI );  $0,25 \mu\text{g/ml}$  ( 2x CMI ); y  $0,5 \mu\text{g/ml}$  ( 4x CMI ) de imipenem provocó un enlentecimiento del crecimiento bacteriano de estos cultivos que, al término de la exposición, mostraban un aumento de su población bacteriana respecto al inóculo preexposición de 0,39 , 0,29 y 0,16  $\log_{10}$  UFC/ml respectivamente ( Tabla III ). No hubo lisis celular aunque sí un enlentecimiento en el crecimiento bacteriano.

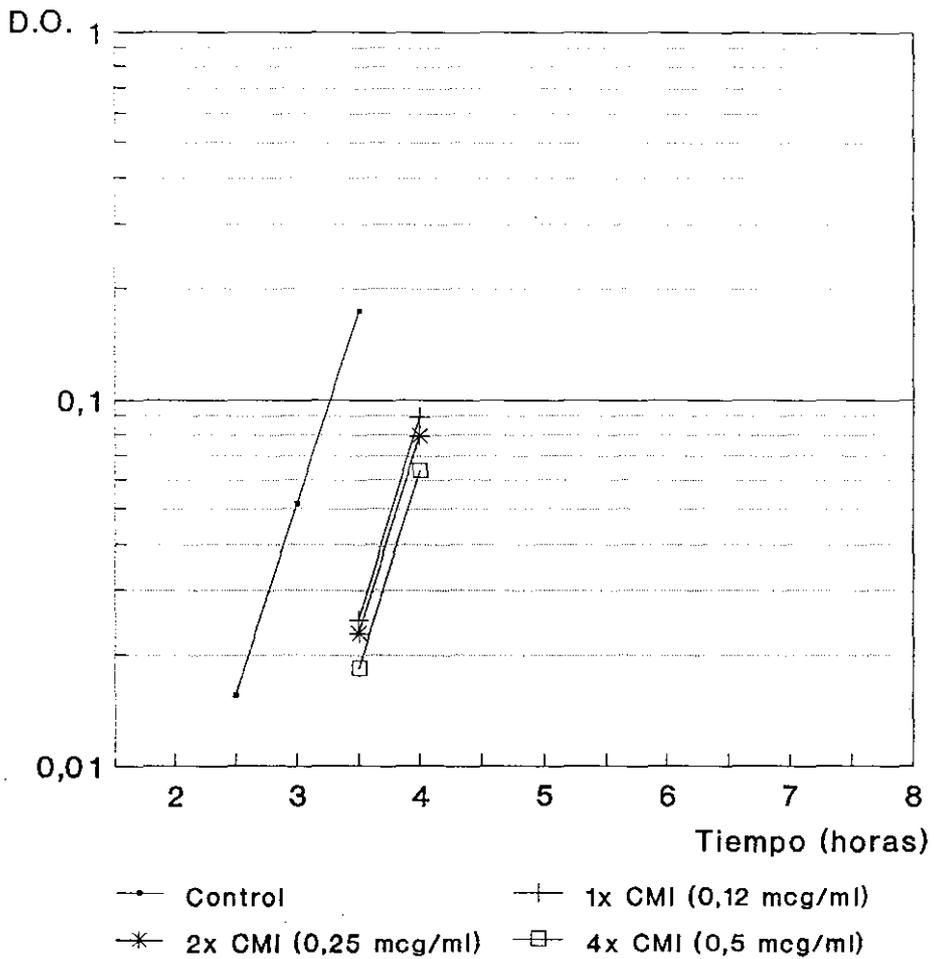
Las extensiones de estos cultivos en portaobjetos teñidas con Giemsa y observadas al microscopio óptico, permitió notar la presencia de esferoplastos así como algunas bacterias con formas aberrantes sin que existiese formación de filamentos.

La Figura 47 muestra la curva D.O.-tiempo de estos cultivos.

Todas las concentraciones ensayadas de imipenem tenían EPA sobre *E.coli* ATCC 25922 aunque de escasa duración. Hay que notar que el aumento de la concentración de antibiótico deparaba un débil aumento del EPA ( Tabla III ). La representación gráfica del mismo aparece reflejada en la Figura 48.

La gráfica recuentos viables (UFC/ml) - tiempo (hs) aparece en la **Figura 49**. El EPA obtenido por esta técnica fue de 0,08 hs; 0,09 hs y 0,12 hs de duración con 1x; 2x y 4x CMI respectivamente ( **Tabla III** ).

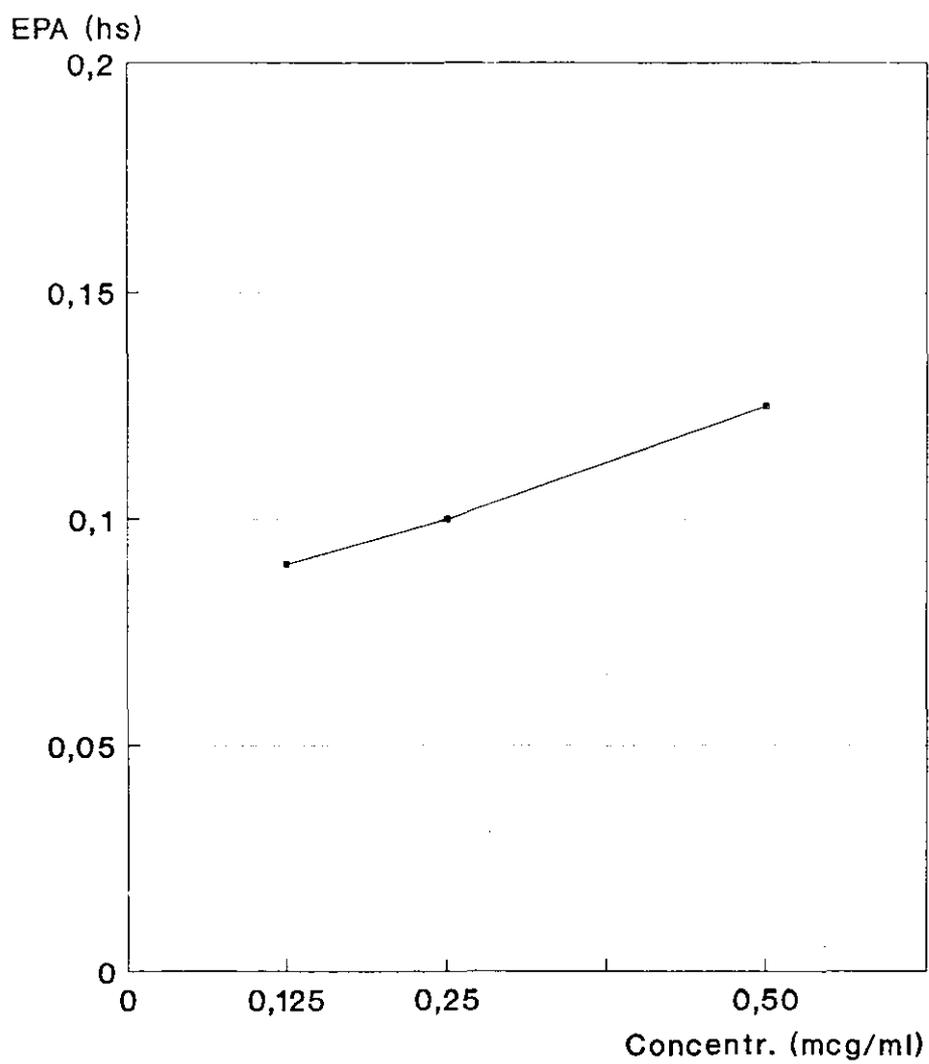
## E.coli ATCC 25922- Imipenem



Curva densidad óptica-tiempo

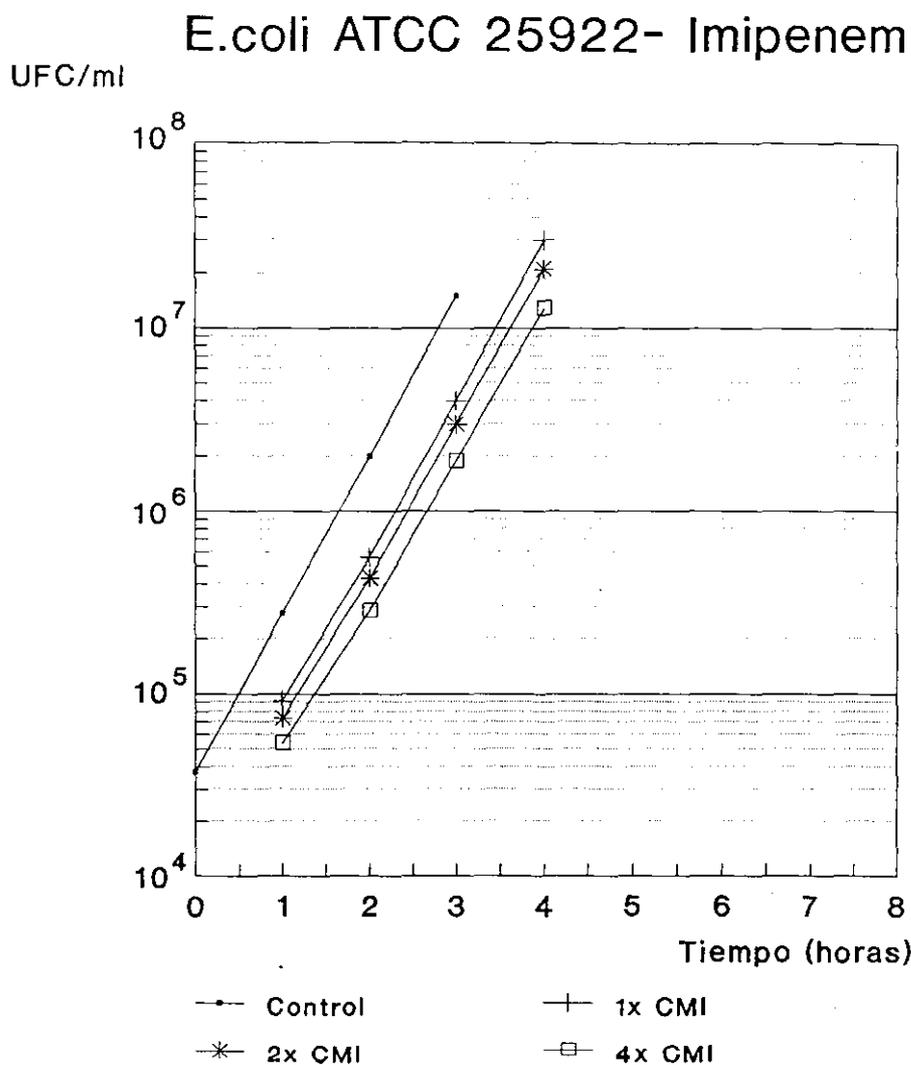
Figura 47.- Cinética de crecimiento, monitorizada por espectrofotometría, de *Escherichia coli* ATCC 25922 tras una hora de exposición a distintas concentraciones de imipenem.

## E.coli ATCC 25922- Imipenem



Curva EPA-concentración antimicrobiana

Figura 48.- Efecto de la concentración de imipenem sobre la duración del EPA.



Curva recuentos bacterianos-tiempo

Figura 49.- Cinética de crecimiento, monitorizada por recuentos viables, de *Escherichia coli* ATCC 25922 tras una hora de exposición a distintas concentraciones de imipenem.

Tabla III.- Relación entre concentración de la droga (  $\mu\text{g/ml}$  ), actividad bactericida (  $\log_{10} r$  ) y EPA ( h. ), determinado fotométricamente y por recuentos viables, tras una hora de exposición al agente antimicrobiano en *Escherichia coli* ATCC 25922.

Concentración de la droga en $\mu\text{g/ml}$ (x CMI)	Disminución del inóculo ( $\log_{10} r$ ) <sup>a</sup>	EPA (h) <sup>a</sup>	
		Fotometría	Recuentos viables
Gentamicina			
0,5 ( 1 )	-0,58 $\pm$ 0,12	0,52 $\pm$ 0,12	0,52 $\pm$ 0,14
1,0 ( 2 )	-0,38 $\pm$ 0,03	0,62 $\pm$ 0,14	0,65 $\pm$ 0,12
2,0 ( 4 )	0,88 $\pm$ 0,92	1,13 $\pm$ 0,07	1,05 $\pm$ 0,04
Ciprofloxacino			
0,007 ( 1 )	0,04 $\pm$ 0,39	0,14 $\pm$ 0,09	0,18 $\pm$ 0,12
0,015 ( 2 )	0,77 $\pm$ 0,24	0,41 $\pm$ 0,10	0,42 $\pm$ 0,12
Ceftriaxona			
0,12 ( 1 )	0,50 $\pm$ 0,06	-0,73 $\pm$ 0,03	-0,75 $\pm$ 0,06
	-0,24 $\pm$ 0,10*	0,00 $\pm$ 0,04*	0,00 $\pm$ 0,03*
0,25 ( 2 )	0,52 $\pm$ 0,14	-0,77 $\pm$ 0,16	-0,80 $\pm$ 0,20
	-0,21 $\pm$ 0,09*	0,00 $\pm$ 0,02*	0,00 $\pm$ 0,01*
0,50 ( 4 )	0,61 $\pm$ 0,07	-0,91 $\pm$ 0,08	-0,92 $\pm$ 0,10
	-0,17 $\pm$ 0,10*	0,02 $\pm$ 0,00*	0,02 $\pm$ 0,00*

<sup>a</sup> Expresado con la media  $\pm$  la desviación estandar.

$$r = N_{\text{inic}} / N_{\text{anti}}$$

\* Valores corregidos para el efecto multinúcleo.

continuación...

Concentración de la droga en $\mu\text{g/ml}$ (x CMI)	Disminución del inóculo ( $\log_{10} r$ ) <sup>a</sup>	EPA (h) <sup>a</sup>	
		Fotometría	Recuentos viables
Piperacilina			
4 ( 1 )	0,39 ± 0,06	-0,57 ± 0,04	-0,59 ± 0,06
	-0,26 ± 0,02*	0,04 ± 0,06*	0,03 ± 0,03*
8 ( 2 )	0,33 ± 0,09	-0,61 ± 0,10	-0,60 ± 0,14
	-0,24 ± 0,06*	0,05 ± 0,10*	0,04 ± 0,08*
16 ( 4 )	0,56 ± 0,10	-0,80 ± 0,07	-0,83 ± 0,05
	-0,17 ± 0,10*	0,02 ± 0,00*	0,04 ± 0,01*
Imipenem			
0,12 ( 1 )	-0,39 ± ND	0,09 ± ND	0,08 ± ND
0,25 ( 2 )	-0,29 ± ND	0,10 ± ND	0,09 ± ND
0,50 ( 4 )	-0,16 ± ND	0,12 ± ND	0,12 ± ND

<sup>a</sup> Expresado con la media ± la desviación estandar.

$$r = N_{\text{inic}} / N_{\text{anti}}$$

\* Valores corregidos para el efecto multinúcleo.

ND.- No determinado. Los resultados se refieren a una experiencia.

#### 4.2.2.ESCHERICHIA COLI 304

Esta cepa corresponde a un aislado clínico de los hemocultivos de un enfermo con pielonefritis aguda y sepsis identificándose bioquímicamente como *Escherichia coli* con el número de congelación 304.

*E.coli* 304 se expuso a concentraciones subinhibitorias (  $\frac{1}{4}$  y  $\frac{1}{2}$  ) de gentamicina y ciprofloxacino además de a 1x y 2x CMI. Ceftriaxona fue ensayada sólo a concentraciones iguales o superiores a la CMI ( 1x, 2x y 4x CMI ).

Los resultados obtenidos se exponen en la **Tabla IV**.

Tabla IV.- Relación entre concentración de la droga (  $\mu\text{g/ml}$  ), actividad bactericida (  $\log_{10} r$  ) y EPA ( h. ), determinado fotométricamente, tras una hora de exposición al agente antimicrobiano en *Escherichia coli* 304.

Concentración de la droga en $\mu\text{g/ml}$ (x CMI)	Disminución del inóculo ( $\log_{10} r$ )	EPA (h)
Gentamicina		
0,06 ( 1/4 )	-0,84	0,58
0,12 ( 1/2 )	-0,78	0,58
0,25 ( 1 )	-0,78	0,60
0,50 ( 2 )	-0,26	0,70
Ciprofloxacino		
0,00175 ( 1/4 )	-0,65	0,07
0,0035 ( 1/2 )	-0,55	0,08
0,007 ( 1 )	-0,09	0,18
0,015 ( 2 )	0,34	0,68
Ceftriaxona		
0,06 ( 1 )	-0,35*	0,05*
0,12 ( 2 )	-0,34*	0,05*
0,25 ( 4 )	-0,30*	0,05*

$$r = N_{\text{inic}} / N_{\text{anti}}$$

\* Valores corregidos para el efecto multinúcleo.

#### 4.2.3.ESCHERICHIA COLI 347

Este aislado clínico fue recuperado en los hemocultivos de un paciente con enfermedad de Hodgkin y sepsis. Se identificó bioquímicamente como *Escherichia coli* y se congeló con el número 347.

Los agentes antibacterianos ensayados en este caso fueron gentamicina y ciprofloxacino a concentraciones iguales a la CMI, sub y suprainhedorias y ceftriaxona e imipenem a 1x, 2x y 4x CMI. Para la determinación del EPA se usó el método espectrofotométrico.

Los resultados obtenidos se exponen en la **Tabla V**.

Tabla V.- Relación entre concentración de la droga (  $\mu\text{g/ml}$  ), actividad bactericida (  $\log_{10} r$  ) y EPA ( h.), determinado fotométricamente, tras una hora de exposición al agente antimicrobiano en *Escherichia coli* 347.

Concentración de la droga en $\mu\text{g/ml}$ (x CMI)	Disminución del inóculo ( $\log_{10} r$ )	EPA (h)
Gentamicina		
0,12 ( 1/4 )	-0,73	0,48
0,25 ( 1/2 )	-0,76	0,55
0,50 ( 1 )	-0,71	0,58
1,00 ( 2 )	-0,11	0,63
Ciprofloxacino		
0,00175 ( 1/4 )	-0,72	0,08
0,0035 ( 1/2 )	-0,57	0,10
0,007 ( 1 )	-0,02	0,12
0,015 ( 2 )	1,22	0,32
Ceftriaxona		
0,03 ( 1 )	-0,02*	0,00*
0,06 ( 2 )	-0,02*	0,00*
0,12 ( 4 )	-0,02*	0,07*
Imipenem		
0,12 ( 1 )	-0,68	0,42
0,25 ( 2 )	-0,71	0,50
0,50 ( 4 )	-0,68	0,55

$$r = N_{\text{inic}} / N_{\text{anti}}$$

\* Valores corregidos para el efecto multinúcleo.

#### 4.3. ENSAYOS CON PSEUDOMONAS AERUGINOSA

##### 4.3.1. PSEUDOMONAS AERUGINOSA ATCC 27853 : VALIDACION DEL CALCULO ESPECTROFOTOMETRICO DEL EPA

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, es una cepa patrón obtenida del American Type Culture Collection en forma liofilizada.

Para utilizarla como cepa de referencia se procedió a la rehidratación del vial con 10 ml de caldo infusión cerebro-corazón ( BHI ) incubándose a 37°C durante 5-6 hs, posteriormente se realizó un subcultivo en placas de agar sangre volviéndose a incubar a 37°C durante toda la noche. A la mañana siguiente, se pudo observar que el cultivo estaba puro, manteniéndose hasta la finalización de los ensayos mediante pases cada 48 hs en placas de agar sangre.

#### 4.3.1.1.CALCULO DEL TIEMPO DE GENERACION

La Figura 50 muestra el cálculo del tiempo de generación de esta cepa patrón utilizando la técnica espectrofotométrica. El tiempo de generación fue de 30 minutos.

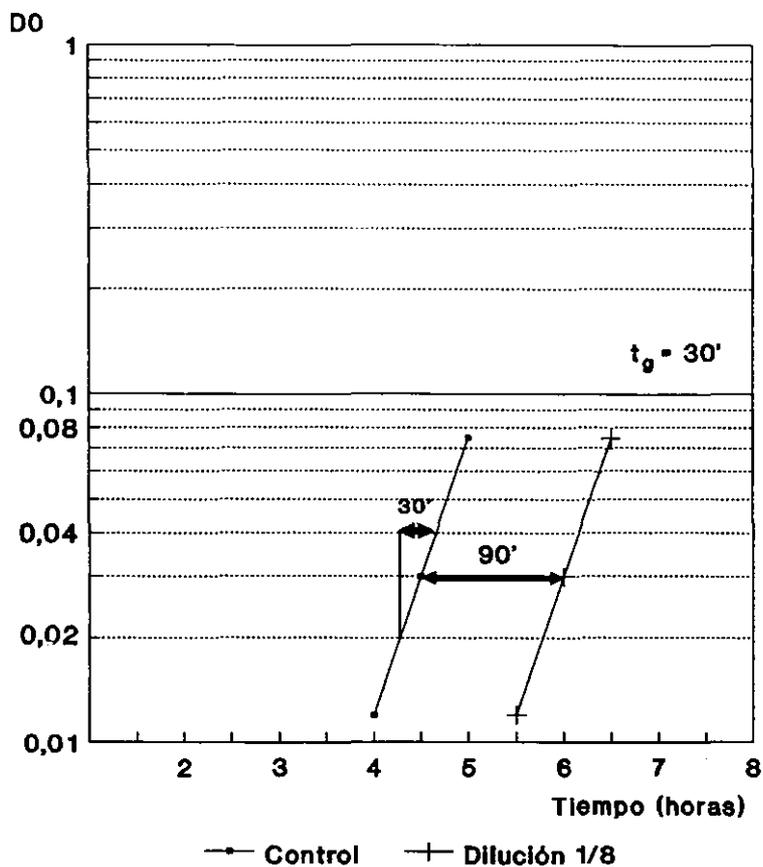


Figura 50.- Curvas de crecimiento logarítmico de un cultivo de *P.aeruginosa* ATCC 27853 y del mismo cultivo diluído 1/8.

Los agentes antimicrobianos ensayados fueron gentamicina, ciprofloxacino, ceftriaxona e imipenem, todos ellos a concentraciones iguales o superiores a la CMI.

4.3.1.2. P.AERUGINOSA ATCC 27853 - GENTAMICINA :  
ENSAYOS DE VALIDACION

La CMI de gentamicina frente a esta cepa patrón fue de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  cuando se determinaba por dilución en caldo, una dilución inferior al rango de concentraciones indicados por el NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1990). Se realizó repetidamente la técnica incluso con gentamicina de distinto fabricante y con dos congelados de la misma cepa de referencia obteniendo siempre esta CMI. Cuando se efectuó la determinación de la CMI por el método de dilución en agar, ésta se situaba en 1  $\mu\text{g/ml}$ , dentro del intervalo de CMI para gentamicina en esta cepa ( NCCLS, 1990 ).

Las bajas CMIs de *P.aeruginosa* frente a gentamicina por dilución en caldo, comparado con el método de dilución en agar, pueden explicarse por el contenido de cationes divalentes. Thornsberry et al. ( 1977 ) observaron que si la concentración de dichos cationes en el caldo no era la apropiada ( 20 a 25 mg de  $\text{Ca}^{++}/\text{L}$  y 10 a 12,5 mg de  $\text{Mg}^{++}/\text{L}$ ), la CMI de los aminoglucósidos frente a esta bacteria en caldo de Mueller-Hinton puede ser diferente de la obtenida sobre agar de Mueller-Hinton.

Cuatro fueron las pruebas que se hicieron poniendo en contacto un cultivo puro en fase logarítmica de crecimiento de *P.aeruginosa* ATCC 27853 con gentamicina.

El inóculo medio bacteriano expuesto fue de  $3-4 \times 10^7$  UFC/ml. Al someterlo durante 1 hora a 1, 2 y 4x CMI de gentamicina ( tomando 0,5  $\mu\text{g/ml}$  como CMI ), se obtuvo una actividad bactericida media nula en el caso de 1 y 2x CMI y descensos en el inóculo inicial de 0,89  $\log_{10}$  UFC/ml con 4x CMI ( Tabla VI ).

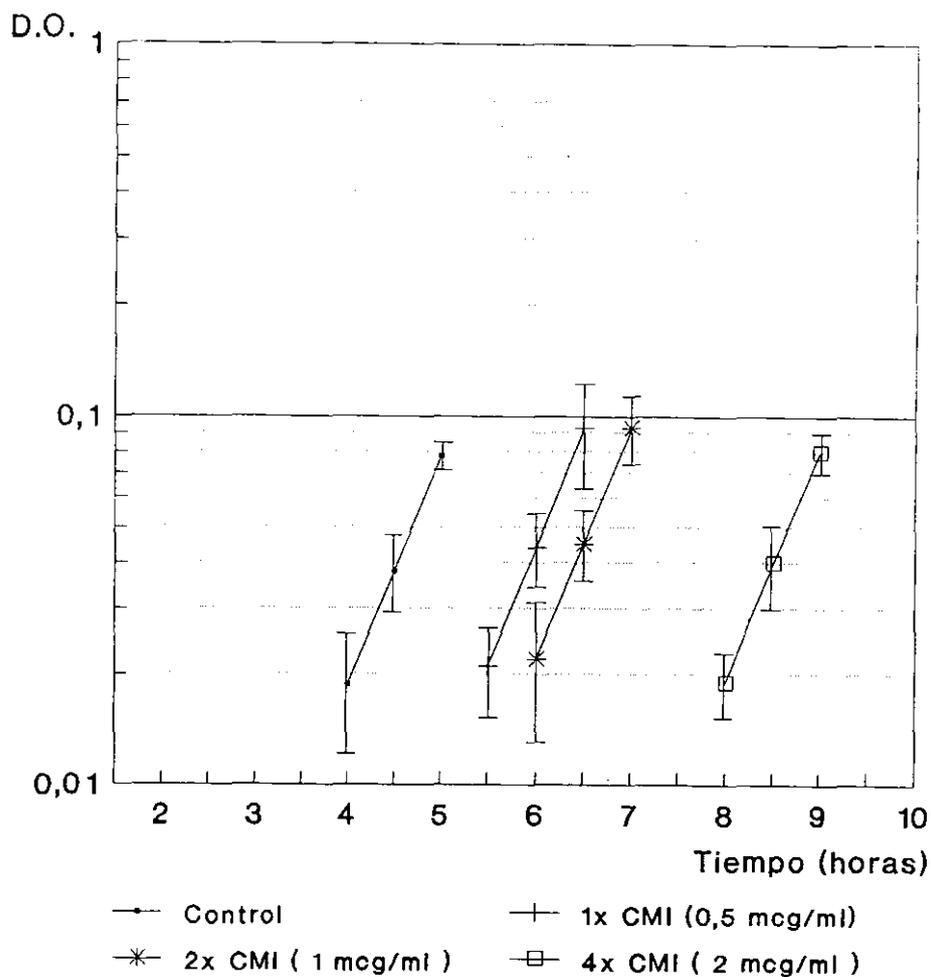
El ciclo de crecimiento de los cultivos control y tratados fue seguido por espectrofotometría. La representación gráfica aparece en la **Figura 51**, donde se encuentran reflejados los valores medios de los 4 experimentos  $\pm$  la desviación estándar. Como se aprecia, las fases exponenciales de cada cultivo son paralelas entre sí, estando separadas de la curva de crecimiento del cultivo control tanto más tiempo cuanto mayor es la concentración de droga añadida.

Teniendo en cuenta estos tiempos de separación ( $t_{sep}$ ) y los recuentos viables en agar, realizados tanto del cultivo control como de los expuestos después de completar el proceso de eliminación del antibiótico, se puede calcular la duración del EPA siendo en el caso de 4x CMI igual a 1,57 hs (**Tabla VI**).

Como se puede observar en la **Figura 52**, en donde se representa la duración media  $\pm$  la desviación estándar del EPA, al aumentar la concentración del antibiótico añadido al cultivo también lo hace la duración del EPA.

La **Figura 53** nos muestra el aumento en el tiempo del  $\log_{10}$  de las UFC/ml de los cultivos control y expuestos. El EPA de gentamicina sobre *P.aeruginosa* ATCC 27853 por recuentos viables fue muy similar al obtenido por el método espectrofotométrico e igual a  $0,32 \pm 0,05$  hs con 1x CMI;  $0,81 \pm 0,09$  hs con 2x CMI y  $1,57 \pm 0,16$  hs con 4x CMI (**Tabla VI**).

## P.aeruginosa ATCC 27853- Gentamicina



Curva densidad óptica-tiempo

Figura 51.- Cinética de crecimiento, monitorizada por espectrofotometría, de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 tras una hora de exposición a distintas concentraciones de gentamicina. Datos presentados con la media  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales) de 4 experiencias.

### P.aeruginosa ATCC 27853- Gentamicina

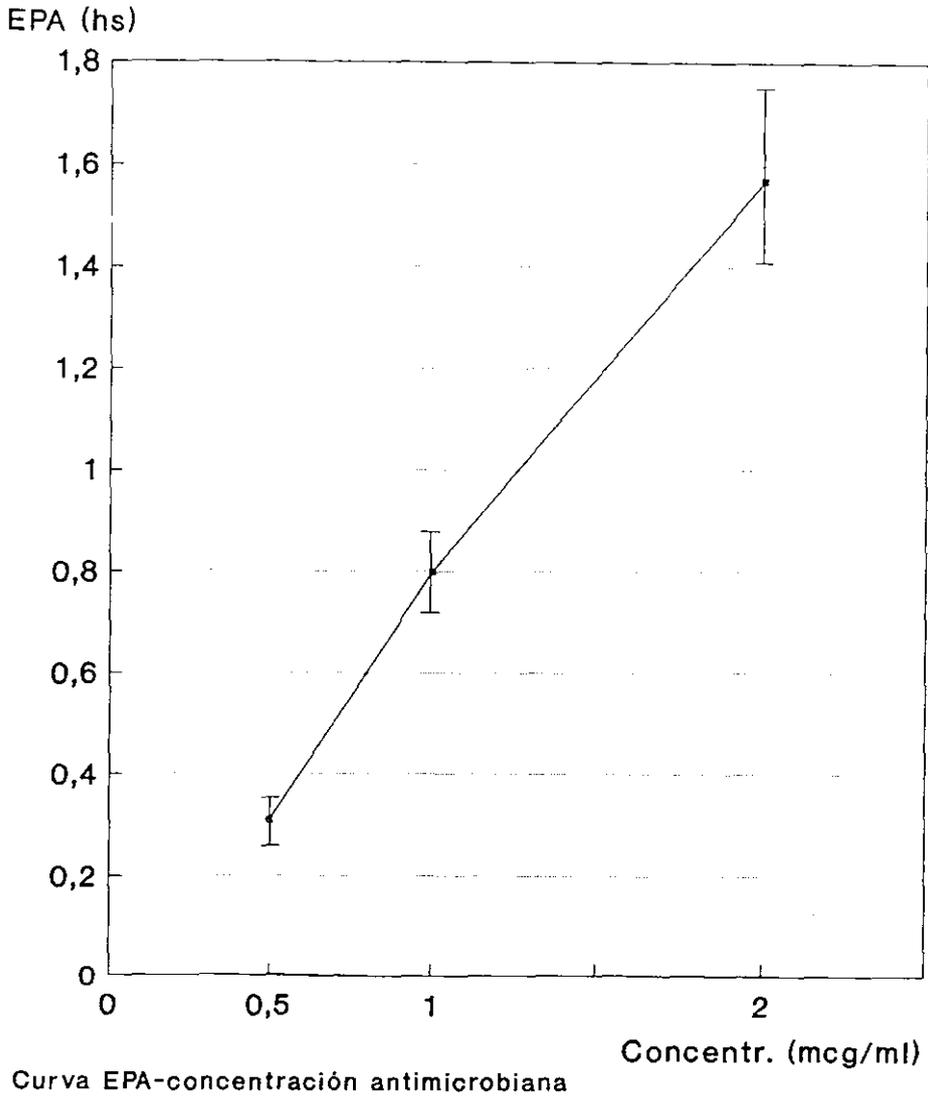
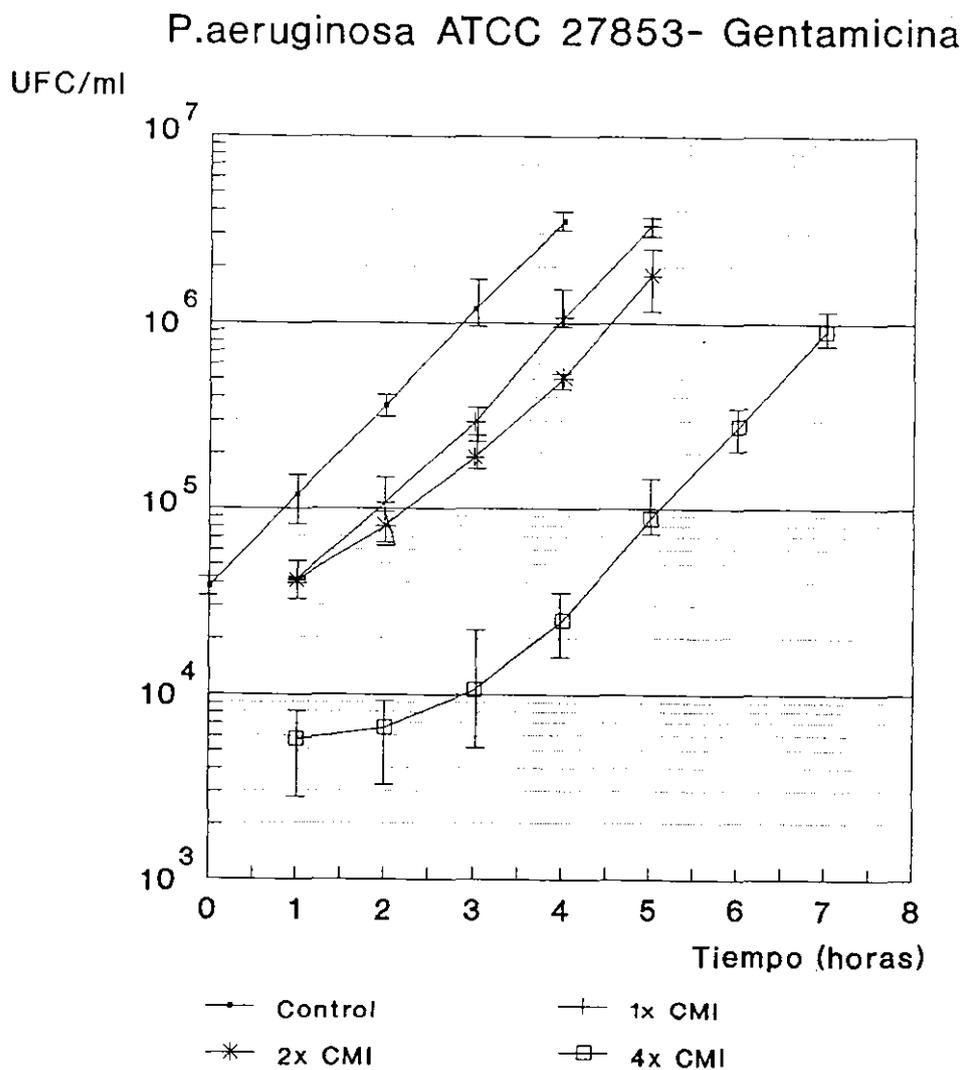


Figura 52.- Efecto de la concentración de gentamicina sobre la duración del EPA. Datos presentados con la media  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales) de 4 experiencias.



Curva recuentos bacterianos-tiempo

Figura 53.- Cinética de crecimiento, monitorizada por recuentos viables, de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 tras una hora de exposición a distintas concentraciones de gentamicina. Datos presentados con la media  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales) de 4 experiencias.

#### 4.3.1.3. P.AERUGINOSA ATCC 27853 - CIPROFLOXACINO : ENSAYOS DE VALIDACION

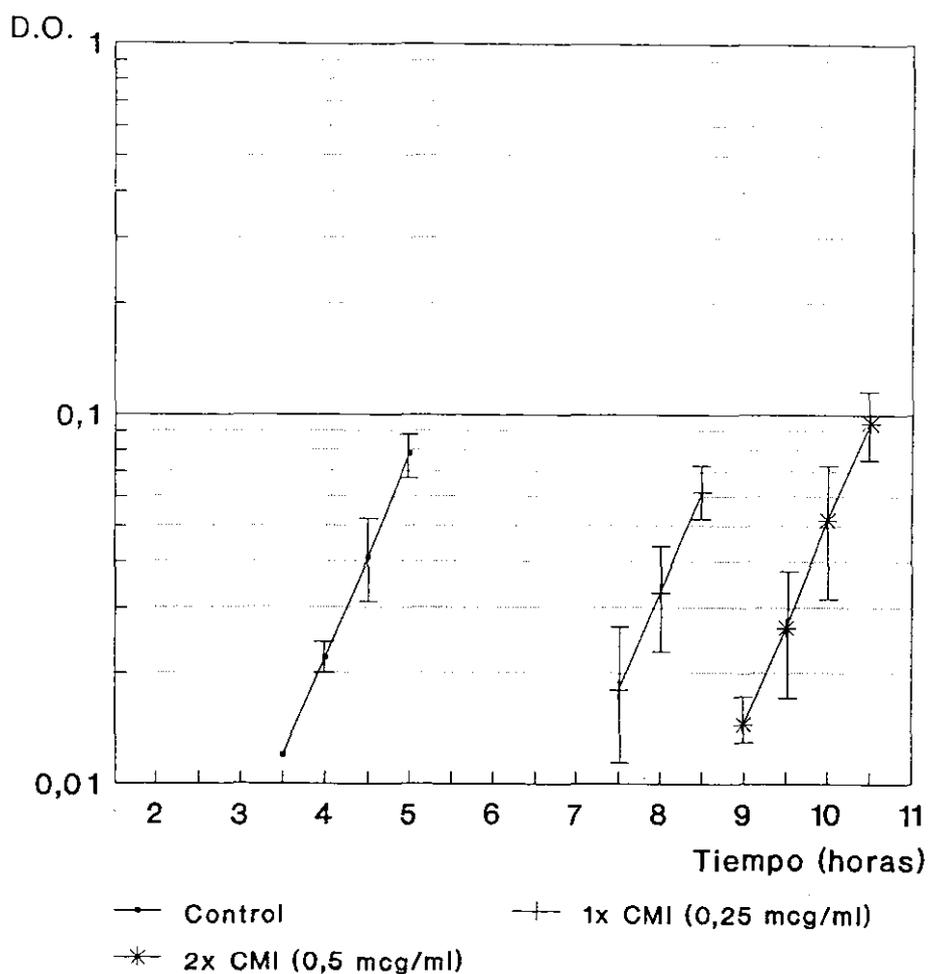
Ciprofloxacino tuvo una actividad bactericida muy marcada cuando se puso en contacto durante una hora a concentraciones de  $0,25 \mu\text{g/ml}$  ( 1x CMI ) y  $0,50 \mu\text{g/ml}$  ( 2x CMI ) con *P.aeruginosa* ATCC 27853; produciéndose descensos en el inóculo inicial (  $4,04 \times 10^7$  UFC/ml ) de  $1,03 \pm 0,18 \log_{10}$  UFC/ml y  $1,87 \pm 0,15 \log_{10}$  UFC/ml respectivamente ( **Tabla VI** ). Estos valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar de 4 pruebas.

En la gráfica de densidad óptica-tiempo ( **Figura 54** ), se puede apreciar la separación existente entre las curvas de crecimiento del cultivo no expuesto al agente antimicrobiano y las de los expuestos, siendo esta separación de más de 3 horas y media para el caso del tratado con 1x CMI y de 5 horas y media para el mezclado con 2x CMI. Este gran  $t_{\text{sep}}$  es producto de los 60' que los cultivos han estado expuestos al agente antimicrobiano, de la actividad bactericida de éste y de la extensión del EPA.

La duración del EPA también fue notable en las dos concentraciones antimicrobianas ensayadas, siendo de  $0,88 \pm 0,08$  hs con 1x CMI y de  $1,27 \pm 0,15$  hs con 2x CMI ( **Tabla VI** ). En la **Figura 55** aparece representado el EPA en función de la concentración antimicrobiana de ciprofloxacino adicionado al cultivo. Al aumentar la concentración aumenta la duración del EPA.

El crecimiento en el tiempo del cultivo control y de los expuestos, determinado por recuentos viables, aparece reflejado en la **Figura 56**. El EPA calculado en base a la definición clásica ( **ecuación 1** ), tiene una duración similar a la obtenida por el método espectrofotométrico siendo de  $0,83 \pm 0,03$  hs para 1x CMI y de  $1,22 \pm 0,04$  hs para 2x CMI ( **Tabla VI** ).

### P.aeruginosa ATCC 27853- Ciprofloxacino



Curva densidad óptica-tiempo

Figura 54.- Cinética de crecimiento, monitorizada por espectrofotometría, de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 tras una hora de exposición a distintas concentraciones de ciprofloxacino. Datos presentados con la media  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales) de 4 experiencias.

### P.aeruginosa ATCC 27853- Ciprofloxacino

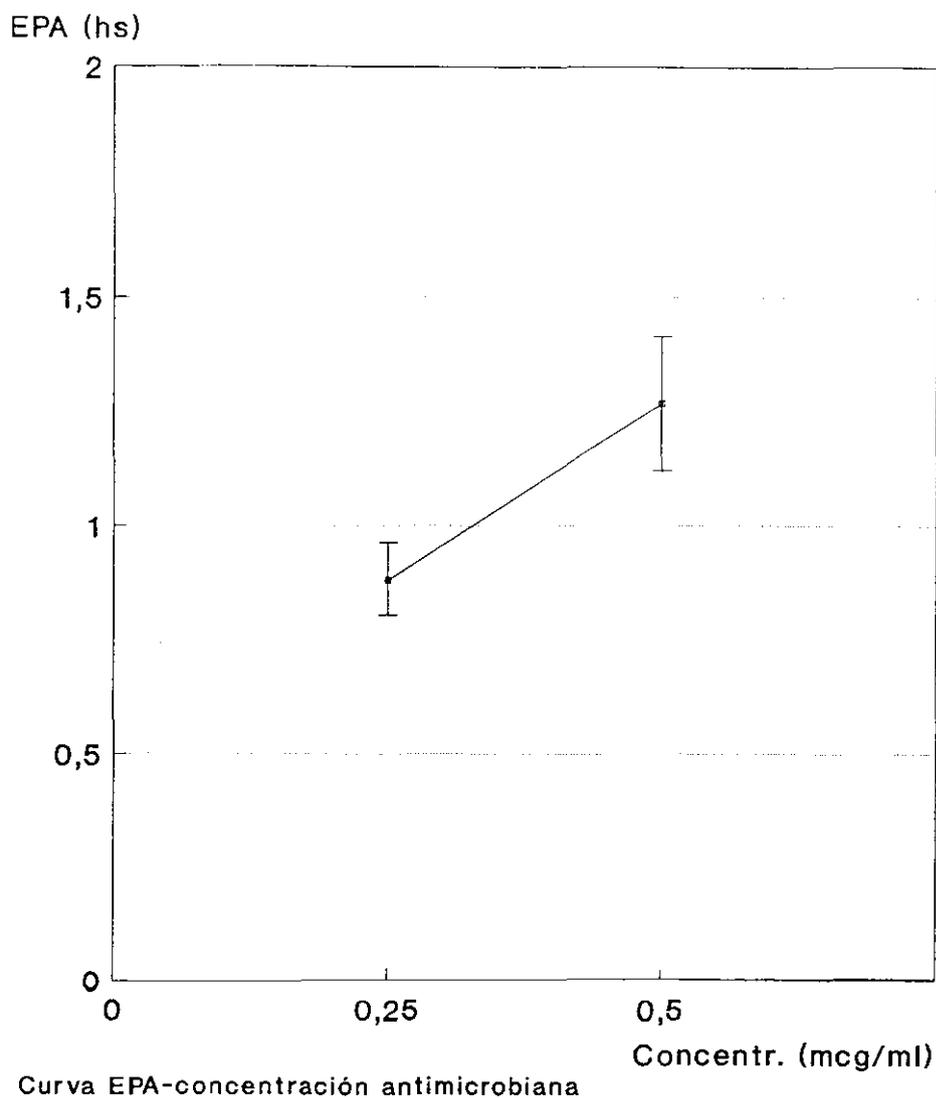
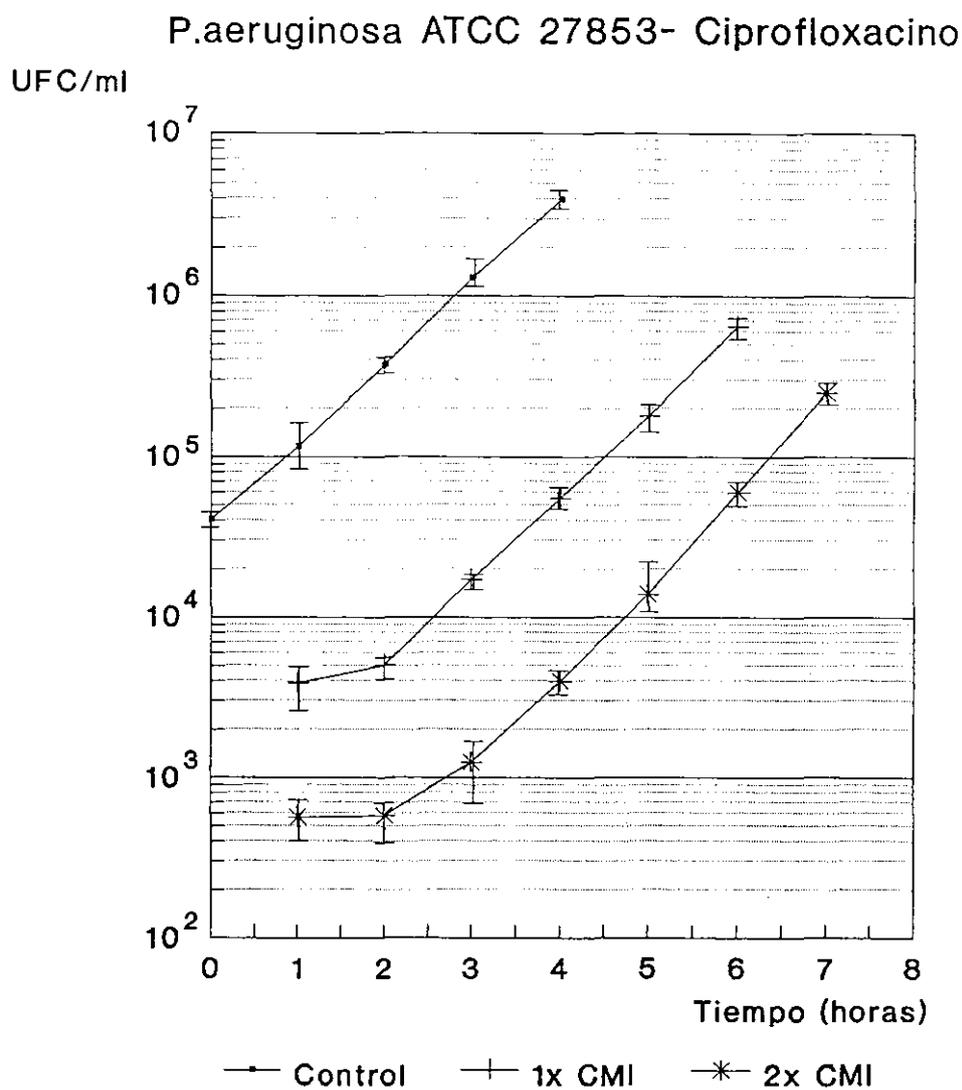


Figura 55.- Efecto de la concentración de ciprofloxacino sobre la duración del EPA. Datos presentados con la media  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales) de 4 experiencias.



Curva recuentos bacterianos-tiempo

Figura 56.- Cinética de crecimiento, monitorizada por recuentos viables, de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 tras una hora de exposición a distintas concentraciones de ciprofloxacino. Datos presentados con la media  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales) de 4 experiencias.

4.3.1.4. P.AERUGINOSA ATCC 27853 - CEFTRIAXONA :  
ENSAYOS DE VALIDACION

Como ocurría con *E.coli* ATCC 25922, ceftriaxona mezclada en concentraciones iguales ( 8  $\mu\text{g/ml}$  ) o superiores a la CMI con *P.aeruginosa* ATCC 27853 a un inóculo de  $3,84 \times 10^7$  UFC/ml produce formación de filamentos. Si estos filamentos se emplazan sobre el agar para obtener los recuentos viables/ml tras la eliminación del antibiótico, se producen contajes falseados ya que se sobreestima la actividad bactericida de este agente. Cuando este artefacto es corregido utilizando los factores de corrección obtenidos por visualización de los cultivos teñidos con Naranja de Acridina, observamos que la disminución del  $\log_{10}$  de las UFC/ml, expresado con el valor medio  $\pm$  la desviación estándar de 3 experimentos, no era de  $0,22 \pm 0,08$ ;  $0,36 \pm 0,13$  y de  $0,39 \pm 0,04$   $\log_{10}$  UFC/ml con 1x; 2x y 4x CMI respectivamente, si no que era en realidad de  $-0,14 \pm 0,1$   $\log_{10}$  UFC/ml para 1x CMI;  $-0,16 \pm 0,11$   $\log_{10}$  UFC/ml para 2x CMI y  $-0,10 \pm 0,07$   $\log_{10}$  UFC/ml para 4x CMI ( Tabla VI ), o sea que durante el tiempo que duró el contacto todos los cultivos experimentaron un ligero crecimiento.

Los factores de corrección aplicados en cada ocasión fueron de 1,1 para el cultivo no expuesto y de 2,6; 3,8 y 3,6 para los tratados con 1x, 2x y 4x CMI respectivamente.

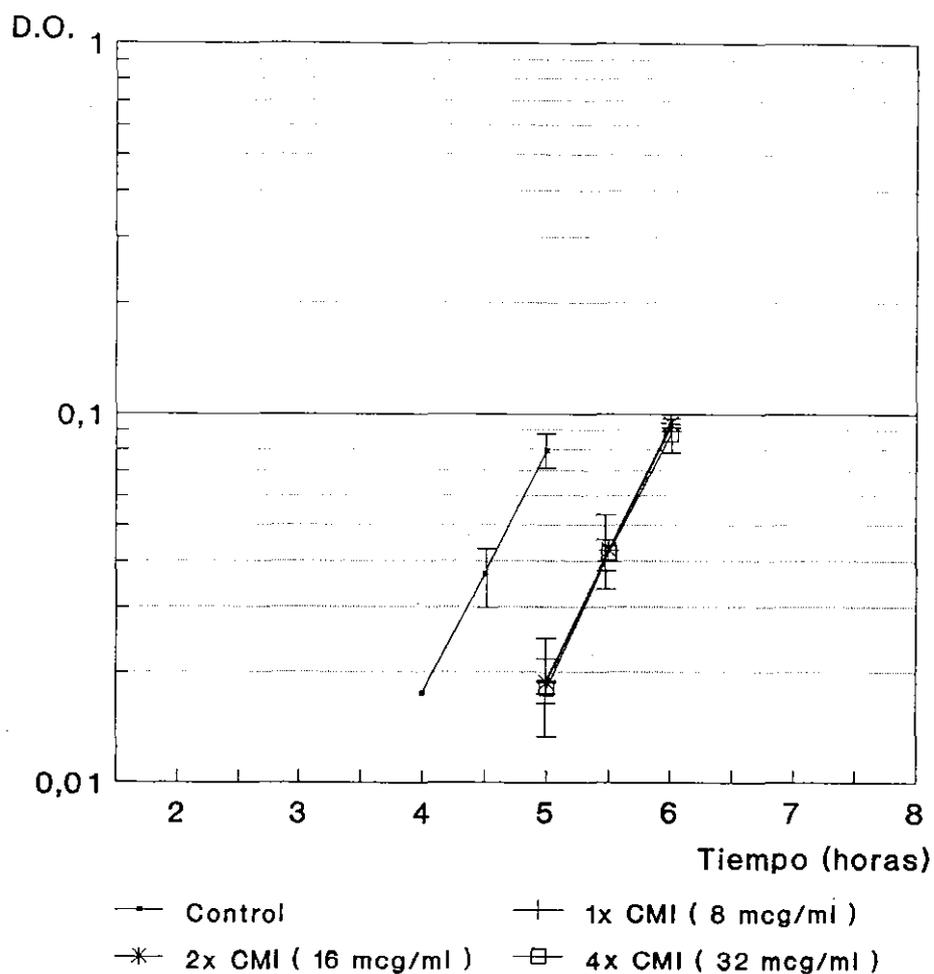
La Figura 57 muestra los valores medios  $\pm$  la desviación estándar de tres experiencias de las medidas de D.O. en el tiempo de cada uno de los cultivos. Como se puede apreciar también existe una agregación en el tiempo de las curvas de crecimiento de los cultivos tratados, al igual que ocurría cuando *E.coli* ATCC 25922 se exponía a este  $\beta$ -lactámico; sin embargo, en el caso de *P.aeruginosa* ATCC 27853, existe un desplazamiento en el tiempo del ciclo de crecimiento de todos los cultivos hacia la derecha debido a que el tiempo de generación (  $t_g$  ) de esta bacteria es

de 30' ( Figura 50 ), en contraste al de *E.coli* ATCC 25922 tasado en 20' ( Figura 30 ).

El EPA calculado en base a los recuentos bacterianos en agar sin corregir sale negativo ( Figura 58 ) e igual a  $-0,44 \pm 0,09$  hs con 1x CMI;  $-0,65 \pm 0,15$  hs con 2x CMI y  $-0,69 \pm 0,06$  hs con 4x CMI ( Tabla VI ). Esto es debido a la formación de filamentos de *P.aeruginosa* ATCC 27853 en contacto con ceftriaxona y posterior recuperación en bacilos Gram negativos normales. Esta recuperación ocurre entre las dos horas siguientes a la eliminación del antibiótico ( Figura 59 ).

El EPA real ( Figura 58 ), una vez multiplicado los recuentos viables por su factor de corrección correspondiente, es muy similar en las tres concentraciones antibióticas ensayadas, siendo su duración de  $0,12 \pm 0,12$  hs con 1x CMI;  $0,15 \pm 0,11$  hs con 2x CMI y  $0,10 \pm 0,08$  hs con 4x CMI ( Tabla IV ) por el método espectrofotométrico y de  $0,09 \pm 0,11$  hs con 1x CMI;  $0,13 \pm 0,07$  hs con 2x CMI y  $0,13 \pm 0,06$  hs con 4x CMI por el método de recuentos viables ( Tabla VI ).

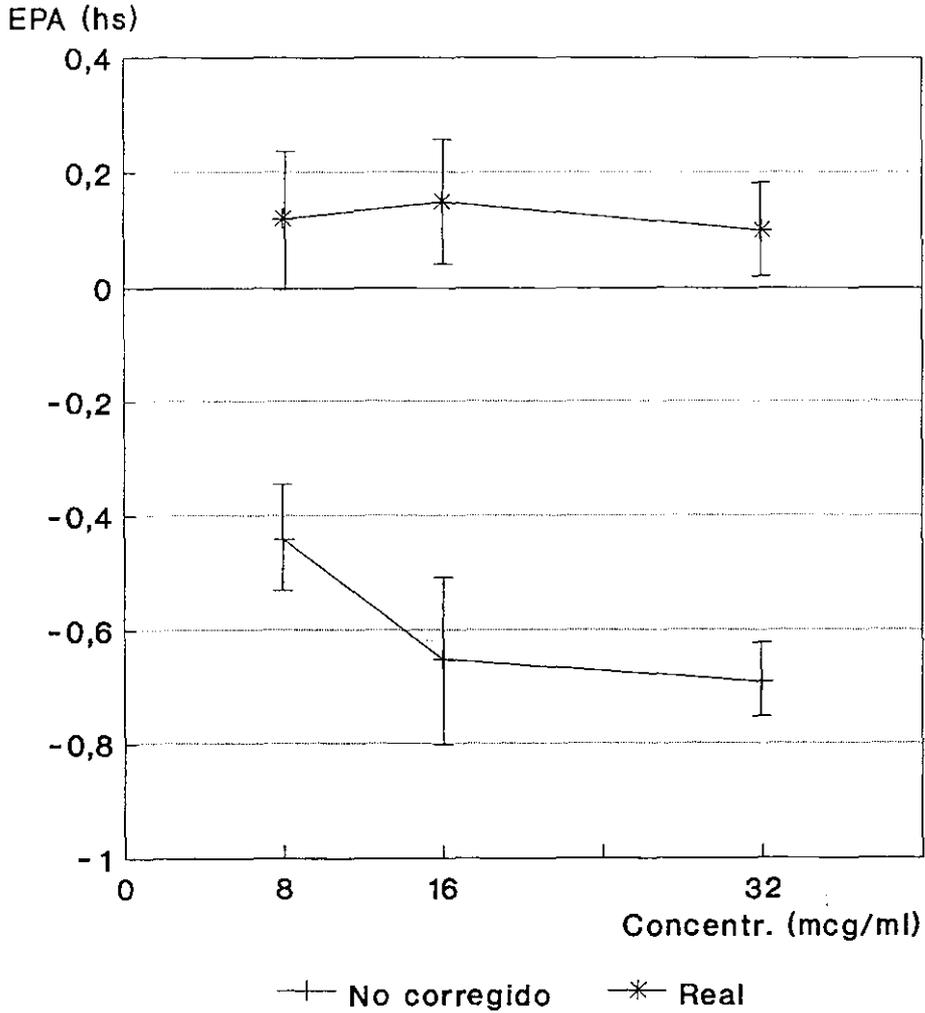
## P.aeruginosa ATCC 27853- Ceftriaxona



Curva densidad óptica-tiempo

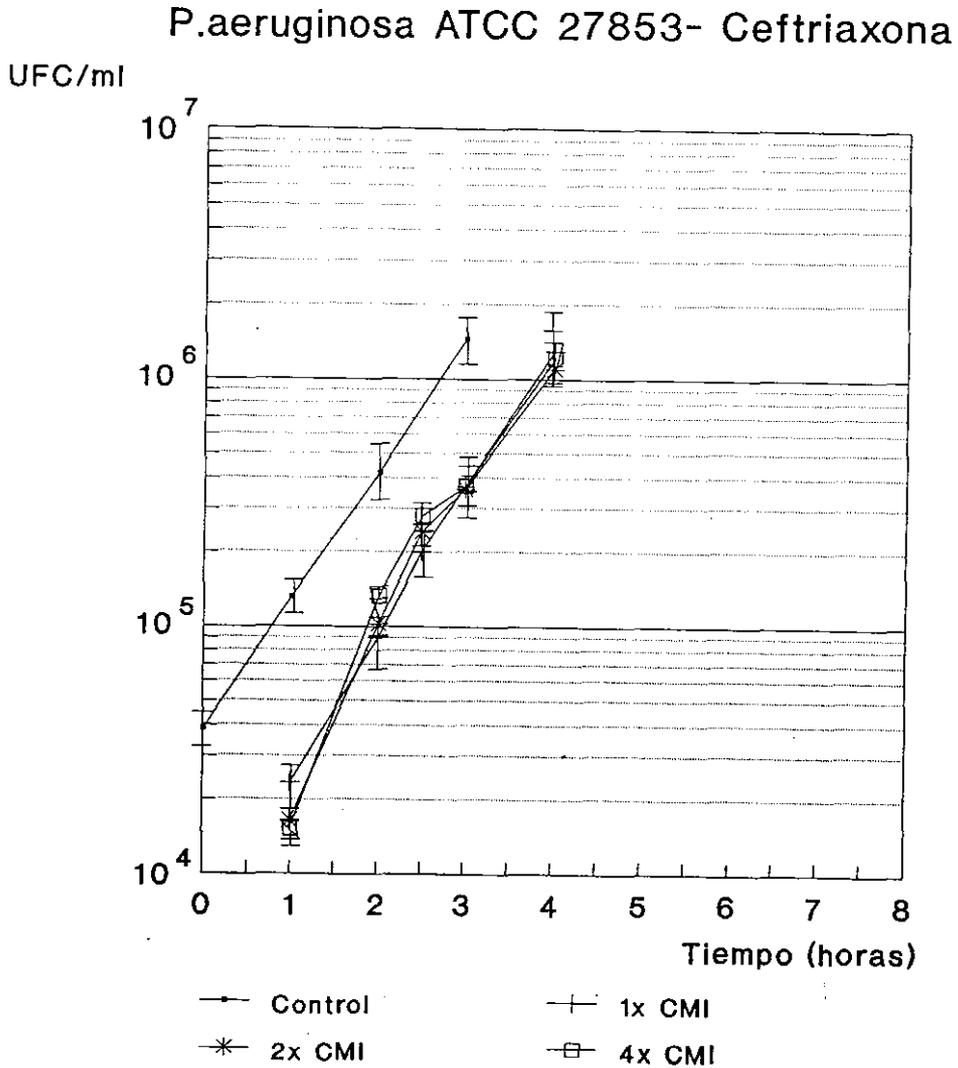
Figura 57.- Cinética de crecimiento, monitorizada por espectrofotometría, de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 tras una hora de exposición a distintas concentraciones de ceftriaxona. Datos presentados con la media  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales) de 3 experiencias.

*P.aeruginosa* ATCC 27853- Ceftriaxona



Curva EPA-concentración antimicrobiana

Figura 58.- Efecto de la concentración de ceftriaxona sobre la duración del EPA. Datos presentados con la media  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales) de 3 experiencias.



Curva recuentos bacterianos-tiempo

Figura 59.- Cinética de crecimiento, monitorizada por recuentos viables, de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 tras una hora de exposición a distintas concentraciones de ceftriaxona. Datos presentados con la media  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales) de 3 experiencias.

4.3.1.5. P.AERUGINOSA ATCC 27853 - IMIPENEM :  
ENSAYOS DE VALIDACION

Imipenem fue ensayado frente a *P.aeruginosa* ATCC 27853 a concentraciones iguales ( 2  $\mu\text{g/ml}$  ) y superiores ( 2x, 4x) a la CMI. El  $\beta$ -lactámico estuvo en contacto durante una hora con un cultivo puro de esta bacteria en fase logarítmica de crecimiento; finalizado el contacto, se eliminó por dilución  $10^{-3}$  y se realizaron extensiones en portaobjetos para ver la morfología bacteriana y en placas de agar de Mueller-Hinton, para observar el efecto bactericida mediante recuento de las UFC/ml.

Los resultados que se obtuvieron teniendo en cuenta los recuentos viables en placa eran imposibles ya que ponían de manifiesto una actividad bactericida muy marcada en las tres concentraciones antibióticas ensayadas, con descensos en la población bacteriana expuesta ( 3,15 x  $10^7$  UFC/ml ) de 2,42  $\log_{10}$  con 1x CMI y 2x CMI y de 2,46  $\log_{10}$  con 4x CMI ( Tabla VI ) y una sorprendente recuperación durante la siguiente hora al término de la cual, los recuentos habían aumentado 1,16  $\log_{10}$  UFC/ml en el 1<sup>er</sup> caso ; 1,17  $\log_{10}$  UFC/ml en el 2<sup>o</sup> y 1,12  $\log_{10}$  en el 3<sup>o</sup> con lo cual, nos salía un EPA negativo tanto por espectrofotometría como por recuentos viables ( Tabla VI ).

Al observar en el microscopio óptico las extensiones teñidas con Giemsa se pudo ver que imipenem imprime alteraciones morfológicas sobre *P.aeruginosa* ATCC 27853 dando lugar a formaciones aberrantes celulares y esferoplastos ( Figura 60 ), no existen formas filamentosas.

La causa de este efecto bactericida tan marcado fue la formación de estos esferoplastos que, debido a su fragilidad, se lisan en la superficie del agar ( Hanberger et al., 1991 ).

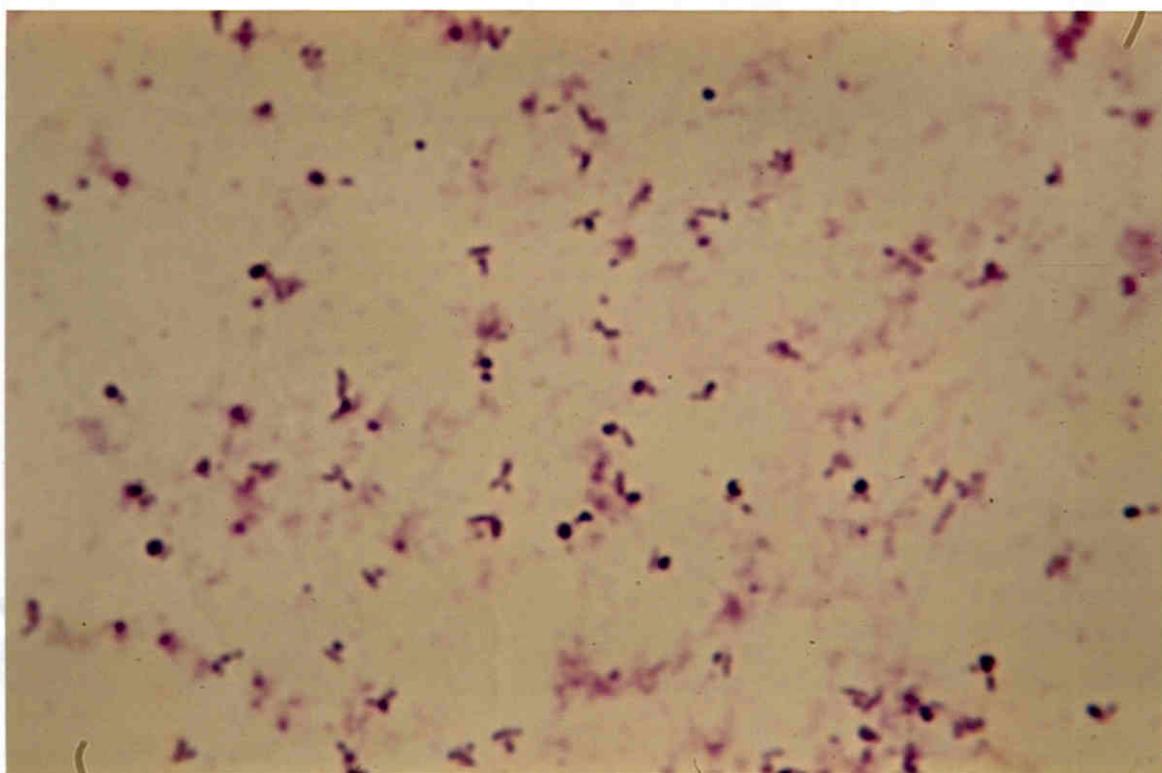


Figura 60.- Alteraciones morfológicas de *P.aeruginosa* ATCC 27853 tras exposición a imipenem ( x1000 aumentos )

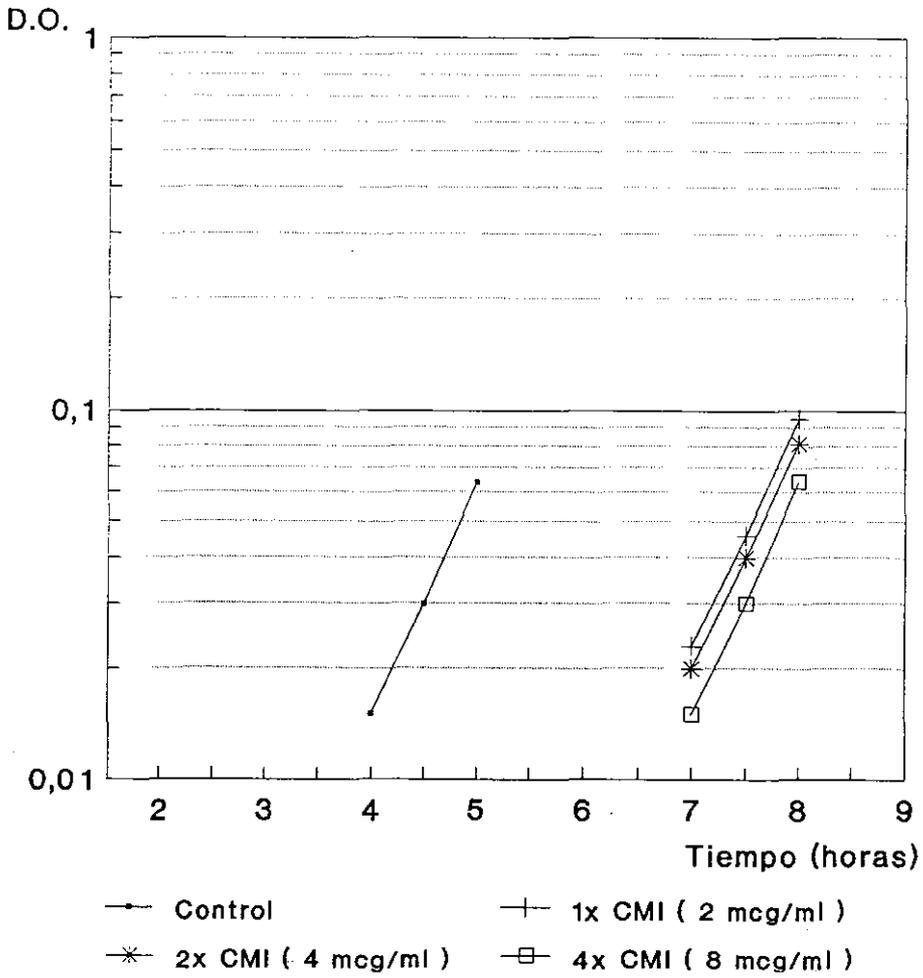
Para obtener la actividad bactericida real de imipenem sobre esta cepa patrón, se efectuó el recuento del número de células que se veían en cada extensión ( la cual contenía 5  $\mu$ l del cultivo tratado ). Con este procedimiento logramos obtener el descenso real del inóculo equivalente a 0,38  $\log_{10}$  UFC/ml para 1x CMI ; 0,41  $\log_{10}$  UFC/ml para 2x CMI y de 0,51  $\log_{10}$  UFC/ml para 4x CMI lo que resulta en un EPA por espectrofotometría de 1,08 ; 1,13 y 1,15 horas de duración con 1, 2 y 4x CMI respectivamente y de 1,00; 1,05 y 1,07 horas con las mismas concentraciones antibióticas por el método clásico ( Tabla VI ).

En la Figura 61 observamos las curvas de crecimiento obtenidas por espectrofotometría de cada uno de los cultivos.

La Figura 62 representa el EPA real obtenido con esta droga por espectrofotometría.

En la Figura 63 aparece la curva de crecimiento del cultivo control y los expuestos obtenida utilizando los recuentos viables originales.

*P.aeruginosa* ATCC 27853- Imipenem



Curva densidad óptica-tiempo

Figura 61.- Cinética de crecimiento, monitorizada por espectrofotometría, de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 tras una hora de exposición a distintas concentraciones de imipenem.

### P.aeruginosa ATCC 27853- Imipenem

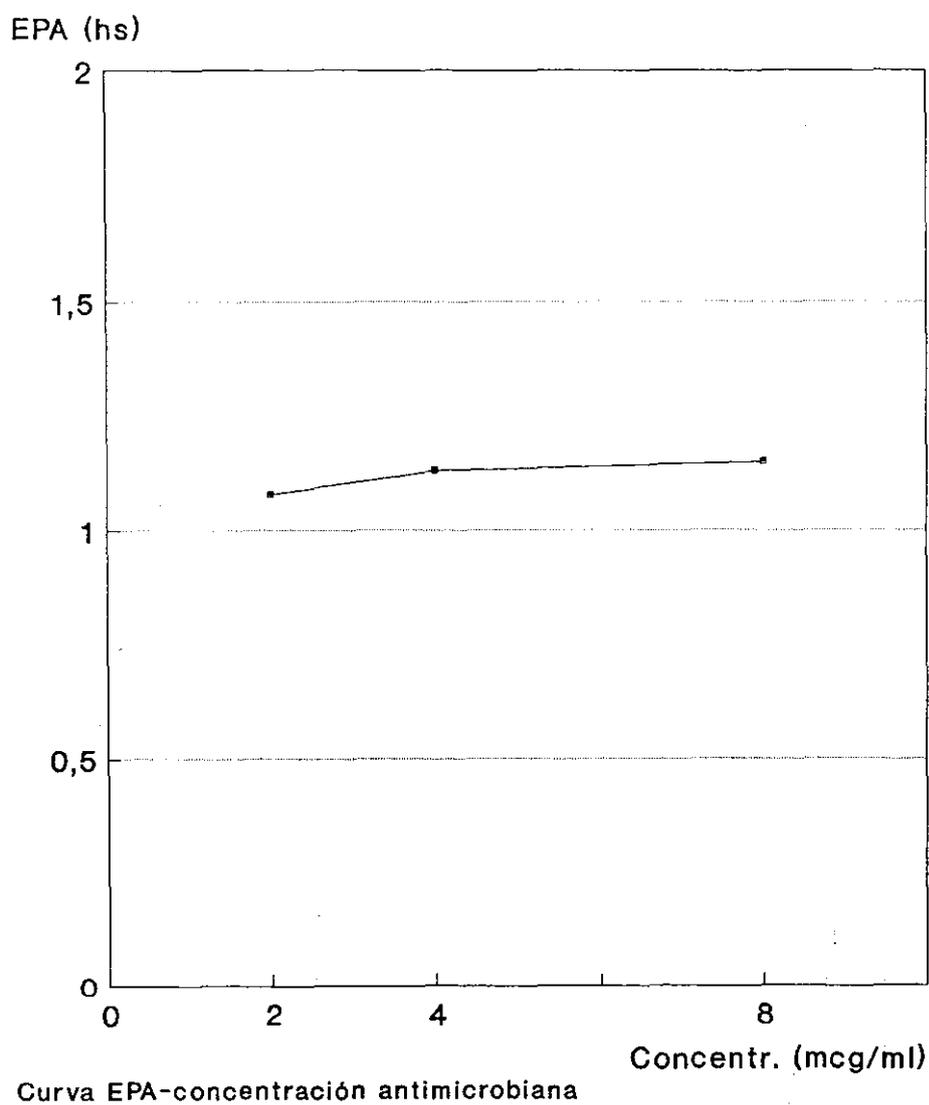
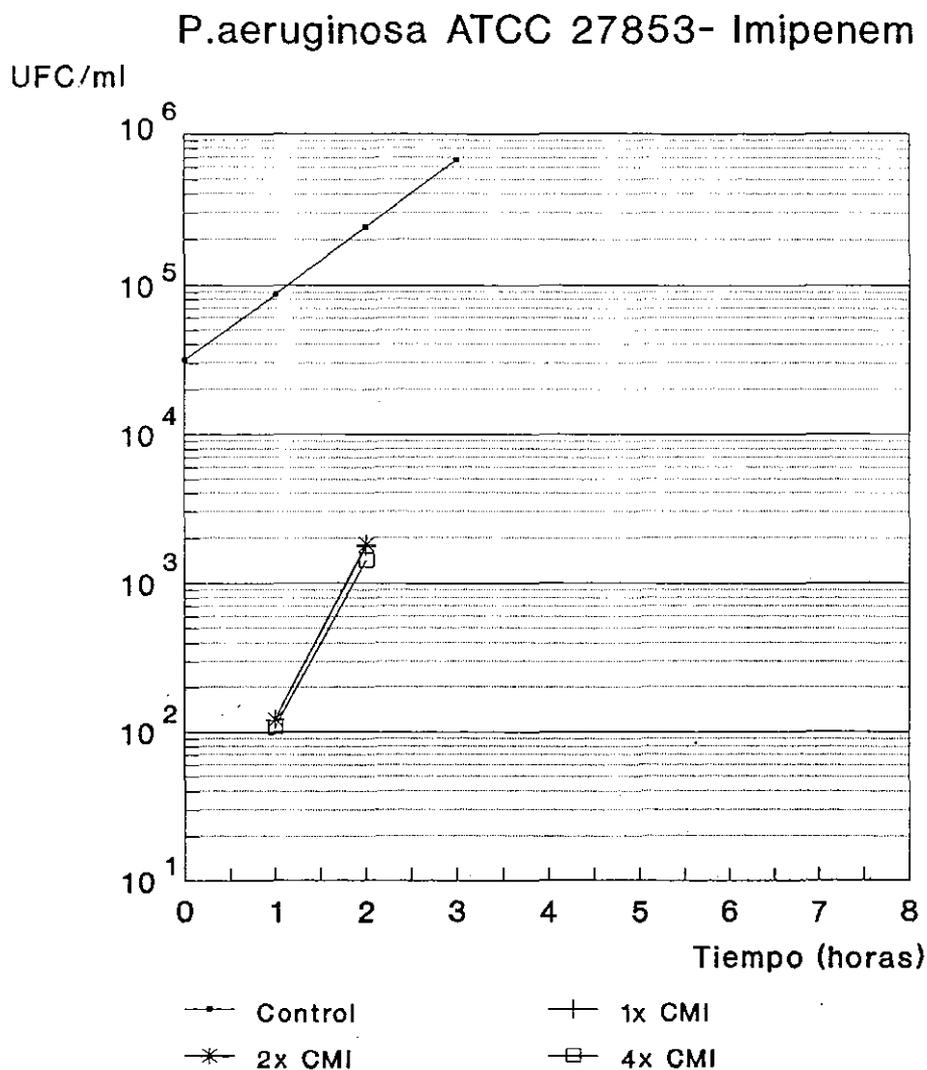


Figura 62.- Efecto de la concentración de imipenem sobre la duración del EPA.



Curva recuentos bacterianos-tiempo

Figura 63.- Cinética de crecimiento, monitorizada por recuentos viables, de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 tras una hora de exposición a distintas concentraciones de imipenem.

Tabla VI.- Relación entre concentración de la droga (  $\mu\text{g/ml}$  ), actividad bactericida (  $\log_{10} r$  ) y EPA ( h. ), determinado fotométricamente y por recuentos viables, tras una hora de exposición al agente antimicrobiano en *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Concentración de la droga en $\mu\text{g/ml}$ (x CMI)	Disminución del inóculo ( $\log_{10} r$ ) <sup>a</sup>	EPA (h) <sup>a</sup>	
		Fotometría	Recuentos viables
Gentamicina			
0,5 ( 1 )	-0,03 $\pm$ 0,08	0,31 $\pm$ 0,05	0,32 $\pm$ 0,05
1,0 ( 2 )	-0,03 $\pm$ 0,04	0,80 $\pm$ 0,08	0,81 $\pm$ 0,09
2,0 ( 4 )	0,89 $\pm$ 0,24	1,57 $\pm$ 0,16	1,57 $\pm$ 0,16
Ciprofloxacino			
0,25 ( 1 )	1,03 $\pm$ 0,18	0,88 $\pm$ 0,08	0,83 $\pm$ 0,03
0,50 ( 2 )	1,87 $\pm$ 0,15	1,27 $\pm$ 0,15	1,22 $\pm$ 0,04
Ceftriaxona			
8 ( 1 )	0,22 $\pm$ 0,08	-0,44 $\pm$ 0,09	-0,46 $\pm$ 0,13
	-0,14 $\pm$ 0,10*	0,12 $\pm$ 0,12*	0,09 $\pm$ 0,11*
16 ( 2 )	0,36 $\pm$ 0,13	-0,65 $\pm$ 0,15	-0,69 $\pm$ 0,12
	-0,16 $\pm$ 0,11*	0,15 $\pm$ 0,11*	0,13 $\pm$ 0,07*
32 ( 4 )	0,39 $\pm$ 0,04	-0,69 $\pm$ 0,06	-0,71 $\pm$ 0,08
	-0,10 $\pm$ 0,07*	0,10 $\pm$ 0,08*	0,13 $\pm$ 0,06*

<sup>a</sup> Expresado con la media  $\pm$  la desviación estandar.

$$r = N_{\text{inic}} / N_{\text{anti}}$$

\* Valores corregidos para el efecto multinúcleo.

continuación...

Concentración de la droga en $\mu\text{g/ml}$ ( $\times$ CMI)	Disminución del inóculo ( $\log_{10} r$ ) <sup>a</sup>	EPA (h) <sup>a</sup>	
		Fotometría	Recuentos viables
Imipenem			
2 ( 1 )	2,42 $\pm$ ND	-1,39 $\pm$ ND	-1,42 $\pm$ ND
	0,38 $\pm$ ND <sup>b</sup>	1,08 $\pm$ ND <sup>b</sup>	1,00 $\pm$ ND <sup>b</sup>
4 ( 2 )	2,42 $\pm$ ND	-1,29 $\pm$ ND	-1,33 $\pm$ ND
	0,41 $\pm$ ND <sup>b</sup>	1,13 $\pm$ ND <sup>b</sup>	1,05 $\pm$ ND <sup>b</sup>
8 ( 4 )	2,46 $\pm$ ND	-1,18 $\pm$ ND	-1,25 $\pm$ ND
	0,51 $\pm$ ND <sup>b</sup>	1,15 $\pm$ ND <sup>b</sup>	1,07 $\pm$ ND <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Expresado con la media  $\pm$  la desviación estandar.

$$r = N_{\text{inic}} / N_{\text{anti}}$$

<sup>b</sup> Valores corregidos para la formación de esferoplastos.

ND.- No determinado. Los resultados se refieren a una experiencia.

#### 4.3.2.PSEUDOMONAS AERUGINOSA 251

Esta cepa fue aislada en los hemocultivos de un enfermo con edema agudo de pulmón y sepsis, identificada bioquímicamente como *P.aeruginosa* y congelada con el número 251.

Los agentes antimicrobianos ensayados fueron gentamicina y ciprofloxacino a  $\frac{1}{4}x$  ;  $\frac{1}{2}x$  ; 1x y 2x CMI y ceftriaxona a 1x, 2x y 4x CMI.

Los resultados obtenidos se exponen en la **Tabla VII**.

Tabla VII.- Relación entre concentración de la droga (  $\mu\text{g/ml}$  ), actividad bactericida (  $\log_{10} r$  ) y EPA ( h.), determinado fotométricamente, tras una hora de exposición al agente antimicrobiano en *Pseudomonas aeruginosa* 251.

Concentración de la droga en $\mu\text{g/ml}$ (x CMI)	Disminución del inóculo ( $\log_{10} r$ )	EPA (h)
Gentamicina		
0,06 ( 1/4 )	-0,16	0,03
0,12 ( 1/2 )	-0,12	0,05
0,25 ( 1 )	-0,11	0,13
0,50 ( 2 )	-0,10	0,23
Ciprofloxacino		
0,015 ( 1/4 )	-0,11	0,20
0,03 ( 1/2 )	0,01	0,36
0,06 ( 1 )	0,73	0,42
0,12 ( 2 )	1,44	0,58
Ceftriaxona		
16 ( 1 )	-0,09*	0,03*
32 ( 2 )	-0,01*	0,02*
64 ( 4 )	0,00*	0,02*

$$r = N_{\text{inic}} / N_{\text{anti}}$$

\* Valores corregidos para el efecto multinúcleo.

#### 4.3.3. PSEUDOMONAS AERUGINOSA 276

*P.aeruginosa* 276 fue aislada de los hemocultivos de un enfermo con sepsis, se identificó bioquímicamente y se congeló con el número 276.

Los antibióticos ensayados fueron gentamicina y ciprofloxacino a  $\frac{1}{4}$  ;  $\frac{1}{2}$  ; 1 y 2x CMI y ceftriaxona e imipenem a 1, 2 y 4x CMI.

Los resultados obtenidos se exponen en la Tabla VIII.

Tabla VIII.- Relación entre concentración de la droga (  $\mu\text{g/ml}$  ), actividad bactericida (  $\log_{10} r$  ) y EPA ( h. ), determinado fotométricamente, tras una hora de exposición al agente antimicrobiano en *Pseudomonas aeruginosa* 276.

Concentración de la droga en $\mu\text{g/ml}$ (x CMI)	Disminución del inóculo ( $\log_{10} r$ )	EPA (h)
Gentamicina		
0,06 ( 1/4 )	-0,28	0,15
0,12 ( 1/2 )	-0,28	0,23
0,25 ( 1 )	-0,19	0,27
0,50 ( 2 )	-0,07	0,30
Ciprofloxacino		
0,015 ( 1/4 )	0,01	0,22
0,03 ( 1/2 )	0,17	0,27
0,06 ( 1 )	0,93	0,33
0,12 ( 2 )	1,85	0,47
Ceftriaxona		
16 ( 1 )	-0,12*	0,02*
32 ( 2 )	-0,04*	0,02*
64 ( 4 )	-0,03*	0,02*
Imipenem		
2 ( 1 )	0,35 <sup>b</sup>	1,06 <sup>b</sup>
4 ( 2 )	0,37 <sup>b</sup>	1,08 <sup>b</sup>
8 ( 4 )	0,47 <sup>b</sup>	1,12 <sup>b</sup>

r = Ninic / Nanti

\* Valores corregidos para el efecto multinúcleo.

<sup>b</sup> Valores corregidos para la formación de esferoplastos.

#### 4.4. ENSAYOS CON STAPHYLOCOCCUS AUREUS

##### 4.4.1. STAPHYLOCOCCUS AUREUS ATCC 29213 : VALIDACION DEL CALCULO ESPECTROFOTOMETRICO DEL EPA

Además de probar nuestro método espectrofotométrico en bacterias Gram negativas quisimos aplicarlo a Gram positivas. Escojimos la cepa patrón de *S.aureus* ATCC 29213 y dos aislados clínicos de hemocultivos de *S.aureus*.

Los agentes antimicrobianos estudiados fueron gentamicina, ciprofloxacino y ceftriaxona, cada uno de ellos se pone en contacto durante una hora a concentraciones iguales o superiores a la CMI con la bacteria en fase logarítmica de crecimiento a un inóculo que oscila entre  $3-5 \times 10^7$  UFC/ml. Una vez terminada la exposición, se elimina el antibiótico por dilución 1/1000, al término de la cual, se siembran volúmenes determinados de cultivo en placas de agar para recuento al día siguiente del número de colonias.

## 4.4.1.1. CALCULO DEL TIEMPO DE GENERACION

La Figura 64 muestra el cálculo del tiempo de generación de esta cepa patrón utilizando la técnica espectrofotométrica. El tiempo de generación fue de 19 minutos.

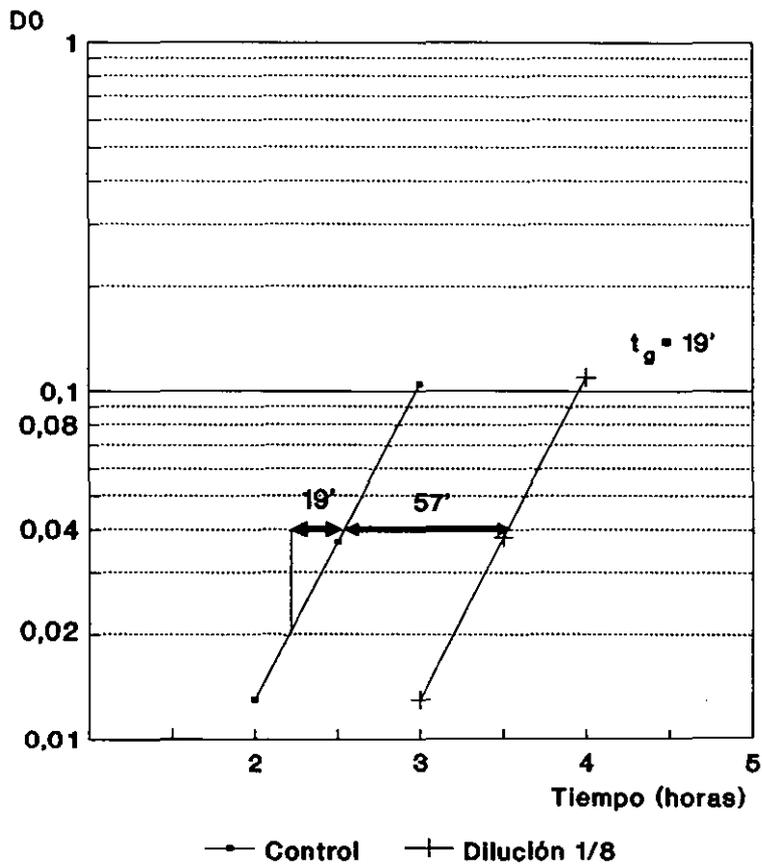


Figura 64.- Curvas de crecimiento logarítmico de un cultivo de *S.aureus* ATCC 29213 y del mismo cultivo diluido 1/8.

#### 4.4.1.2. S.AUREUS ATCC 29213 - GENTAMICINA : ENSAYOS DE VALIDACION

Gentamicina manifestó una actividad bactericida sobre *S.aureus* ATCC 29213 mayor conforme aumentaba la concentración del aminoglucósido en el cultivo ( Tabla IX ), siendo muy acusado con 1  $\mu\text{g/ml}$  ( 4x CMI ), dosis que ocasionó en los tres ensayos realizados un descenso medio de la población bacteriana expuesta ( en UFC/ml ) de  $2,91 \pm 0,12 \log_{10}$ , debido a lo cual, no se ha calculado el EPA por considerarlo de poca importancia en los casos en que existe una gran tasa de lisis celular.

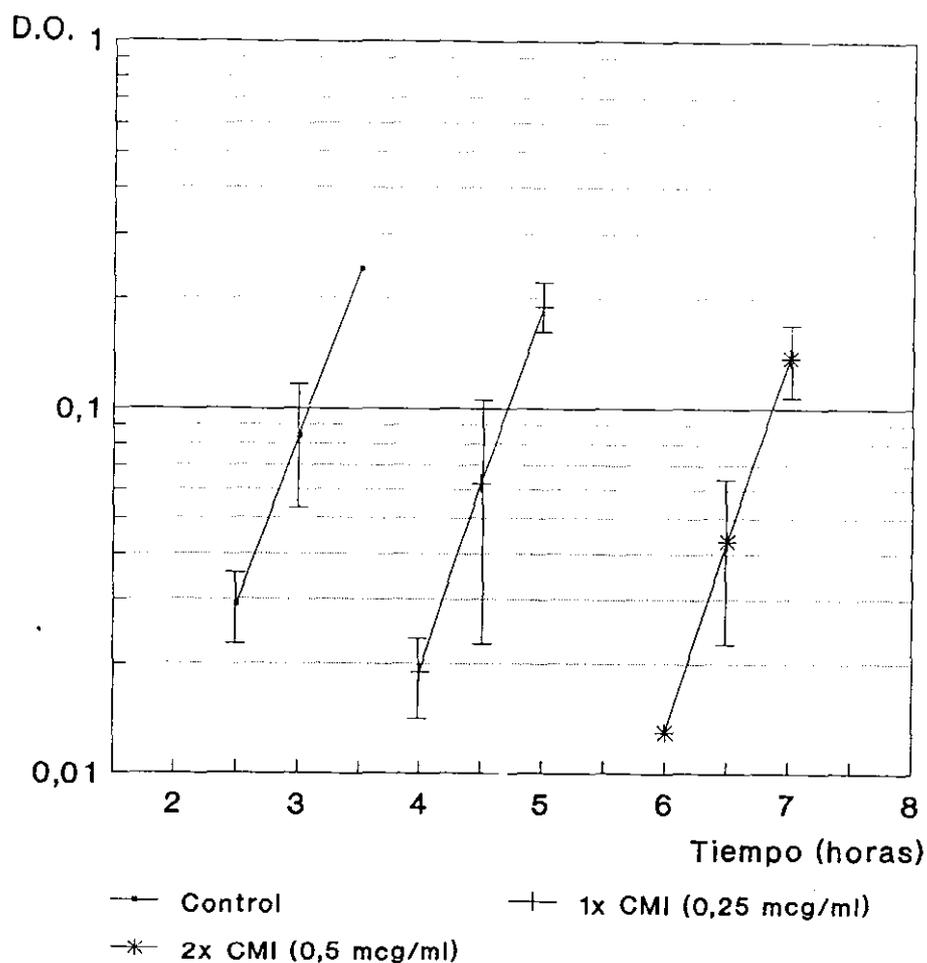
El seguimiento espectrofotométrico del crecimiento bacteriano del cultivo control y de los tratados con 1 y 2x CMI aparece en la Figura 65.

El EPA de este aminoglucósido sobre esta cepa de referencia es bastante pronunciado y dosis dependiente ( Figura 66 ), siendo su duración de  $0,82 \pm 0,14$  hs en el caso de 1x CMI y de  $1,77 \pm 0,14$  hs en el de 2x CMI ( Tabla IX ).

El EPA calculado como la diferencia en el tiempo que tarda el cultivo tratado y el control respectivamente, en incrementar sus recuentos bacterianos viables 1  $\log_{10}$ , respecto al contaje obtenido una vez que se ha procedido a la eliminación del antibiótico, fue de  $0,71 \pm 0,22$  hs para 1x CMI y de  $1,80 \pm 0,20$  hs en el caso de 2x CMI ( Tabla IX ).

La curva de crecimiento monitorizada por recuentos viables de los cultivos control y tratados, sobre la que se hace el cálculo del EPA por el método clásico, aparece dibujada en la Figura 67.

## S.aureus ATCC 29213- Gentamicina



Curva densidad óptica-tiempo

Figura 65.- Cinética de crecimiento, monitorizada por espectrofotometría, de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 tras una hora de exposición a distintas concentraciones de gentamicina. Datos presentados con la media  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales) de 3 experiencias.

## S.aureus ATCC 29213- Gentamicina

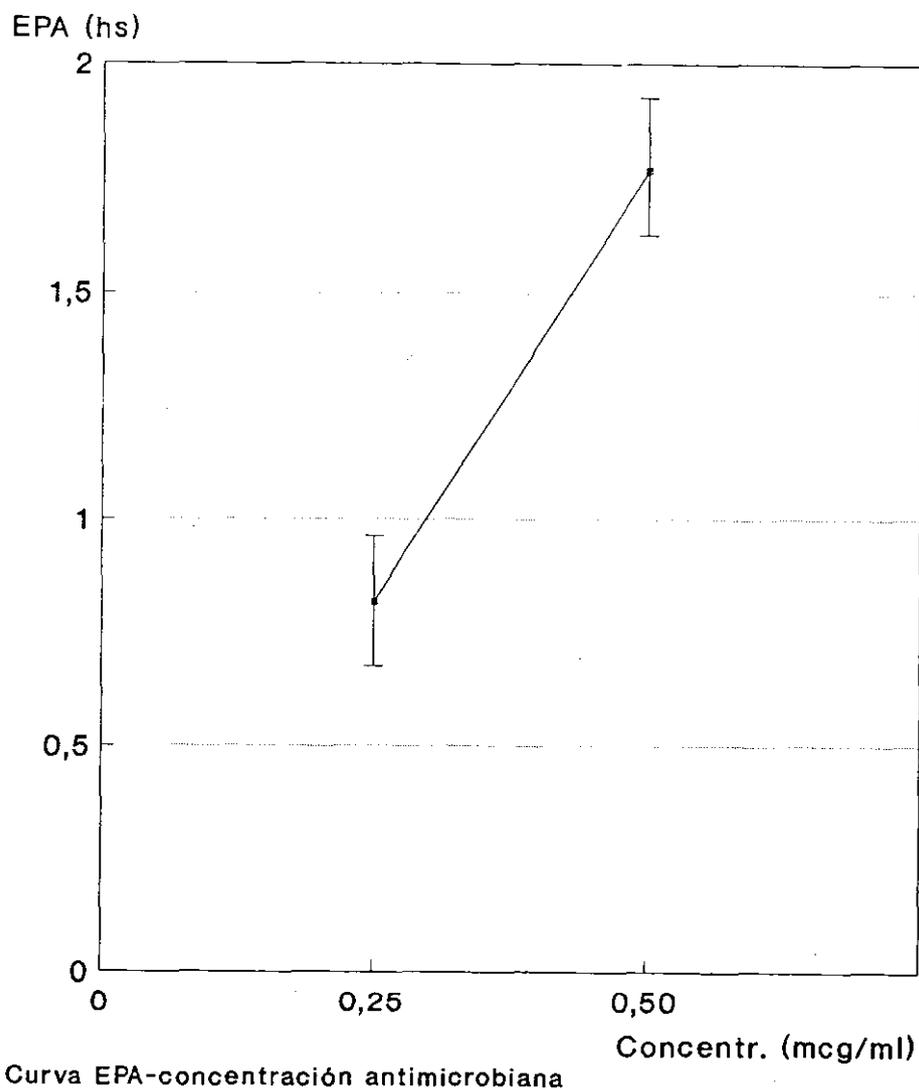
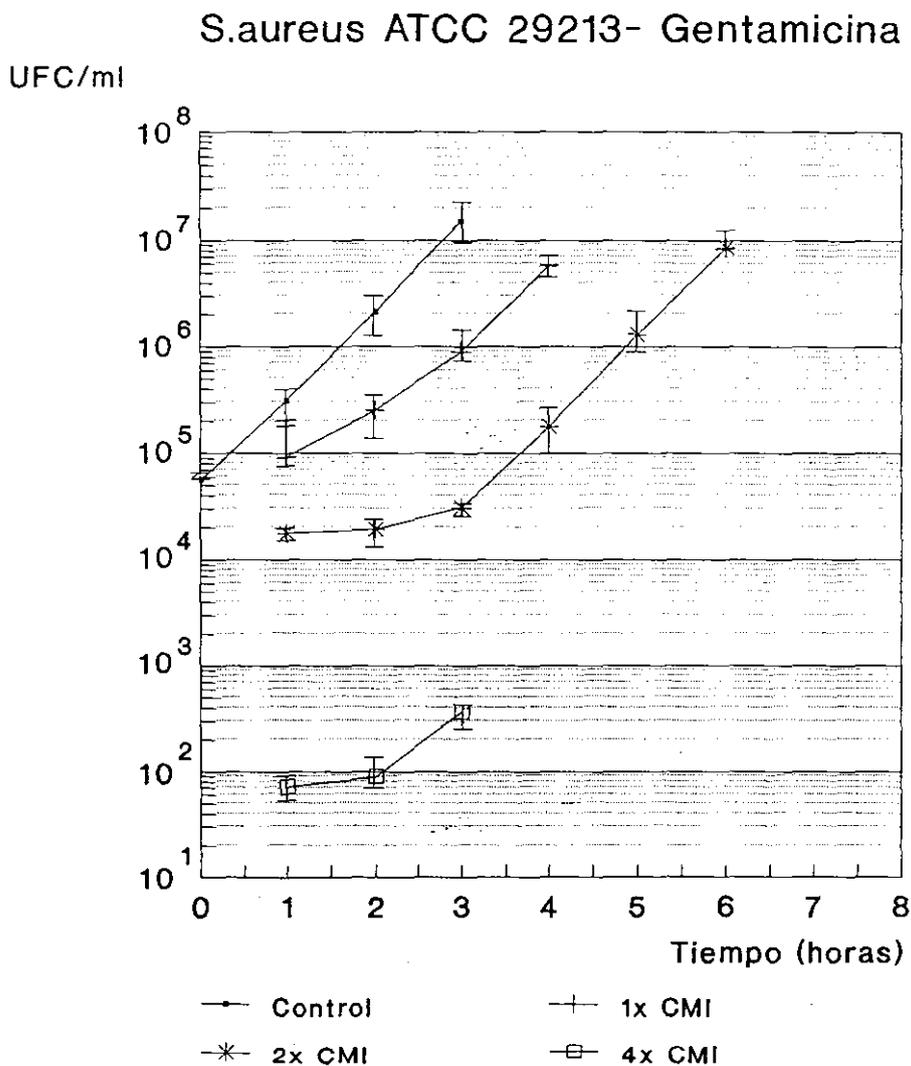


Figura 66.- Efecto de la concentración de gentamicina sobre la duración del EPA. Datos presentados con la media  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales) de 3 experiencias.



Curva recuentos bacterianos-tiempo

Figura 67.- Cinética de crecimiento, monitorizada por recuentos viables, de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 tras una hora de exposición a distintas concentraciones de gentamicina. Datos presentados con la media  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales) de 3 experiencias.

#### 4.4.1.3. S.AUREUS ATCC 29213 - CIPROFLOXACINO : ENSAYOS DE VALIDACION

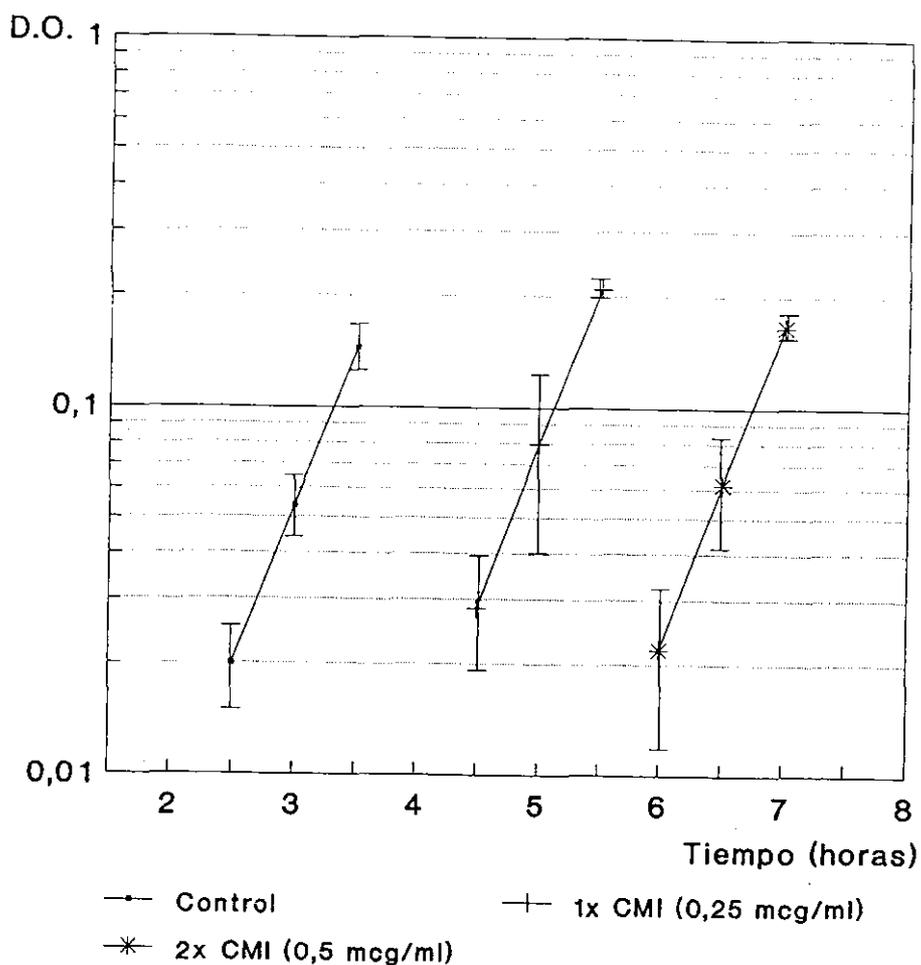
Ciprofloxacino ofreció, tras una hora de contacto con un cultivo puro de *S.aureus* ATCC 29213 a una concentración media de  $4,40 \times 10^7$  UFC/ml una actividad bactericida acusada, sobretodo a la concentración de  $0,5 \mu\text{g/ml}$  (  $2x$  CMI ), que hizo disminuir la concentración celular bacteriana en  $1,68 \pm 0,24 \log_{10}$  UFC/ml; también  $1x$  CMI tuvo una actividad bactericida considerable, siendo el descenso de  $0,49 \pm 0,35 \log_{10}$  UFC/ml ( **Tabla IX** ). Estos datos corresponden a la media  $\pm$  la desviación estándar de 3 ensayos.

La **Figura 68** representa las variaciones de la densidad óptica de cada cultivo bacteriano respecto al tiempo. Podemos observar que las curvas de crecimiento son paralelas y están separadas respecto al control un tiempo (  $t_{sep}$  ) que equivale a la suma del tiempo que estos cultivos han estado expuestos a esta quinolona, más el tiempo teórico que tardan los cultivos tratados en recuperar el inóculo inicial (  $t_{recre}$  ), más el EPA.

El EPA es dosis dependiente, con una duración media  $\pm$  la desviación estándar de 3 experimentos realizados de  $0,55 \pm 0,10$  hs para  $1x$  CMI y de  $0,65 \pm 0,05$  hs para  $2x$  CMI ( **Tabla IX** ). La **Figura 69** muestra la representación gráfica del EPA-Concentración antimicrobiana de ciprofloxacino frente a esta cepa.

El EPA calculado por el método de recuentos viables fue de  $0,54 \pm 0,11$  hs con  $1x$  CMI y de  $0,70 \pm 0,02$  con  $2x$  CMI ( **Tabla IX** ). La gráfica de recuentos bacterianos - tiempo aparece dibujada en la **Figura 70**.

## S.aureus ATCC 29213- Ciprofloxacino



Curva densidad óptica-tiempo

Figura 68.- Cinética de crecimiento, monitorizada por espectrofotometría, de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 tras una hora de exposición a distintas concentraciones de ciprofloxacino. Datos presentados con la media  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales) de 3 experiencias.

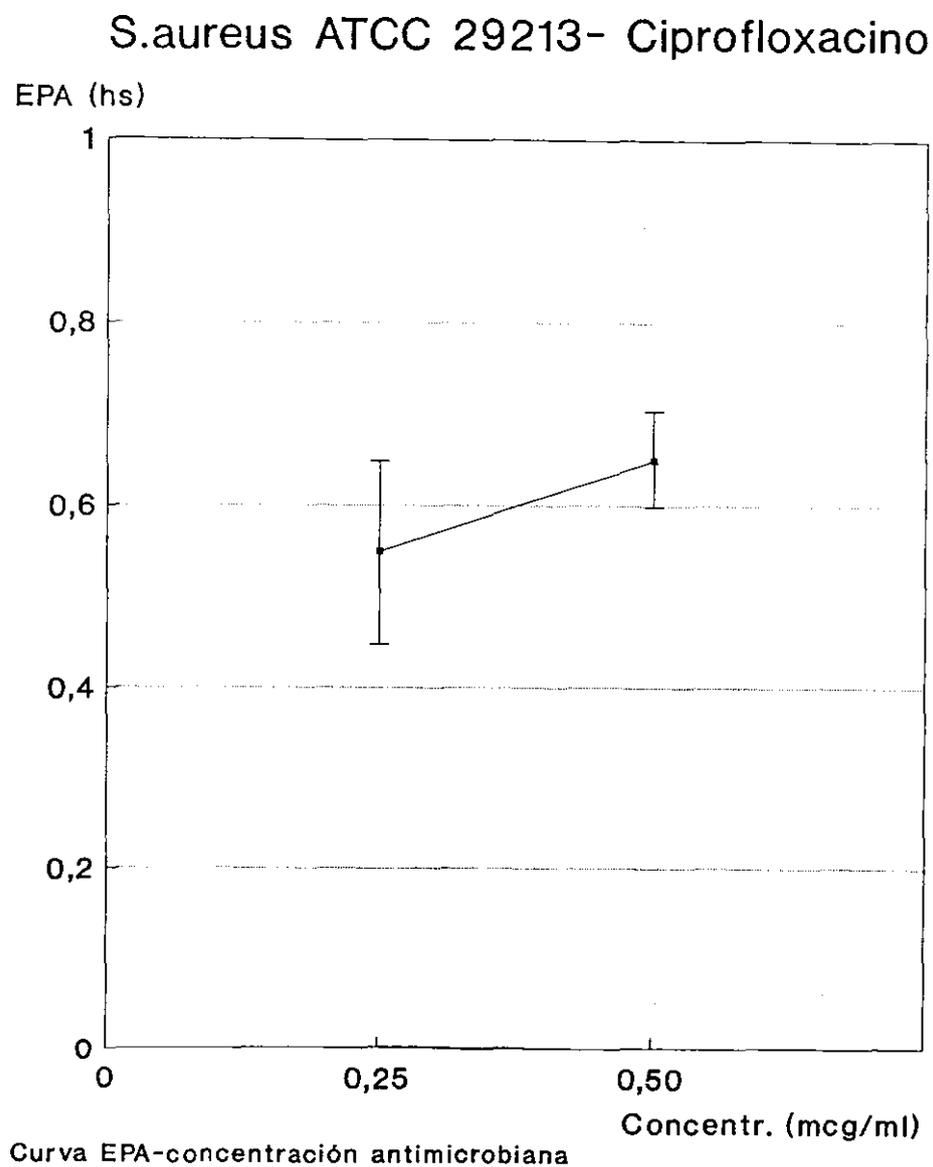
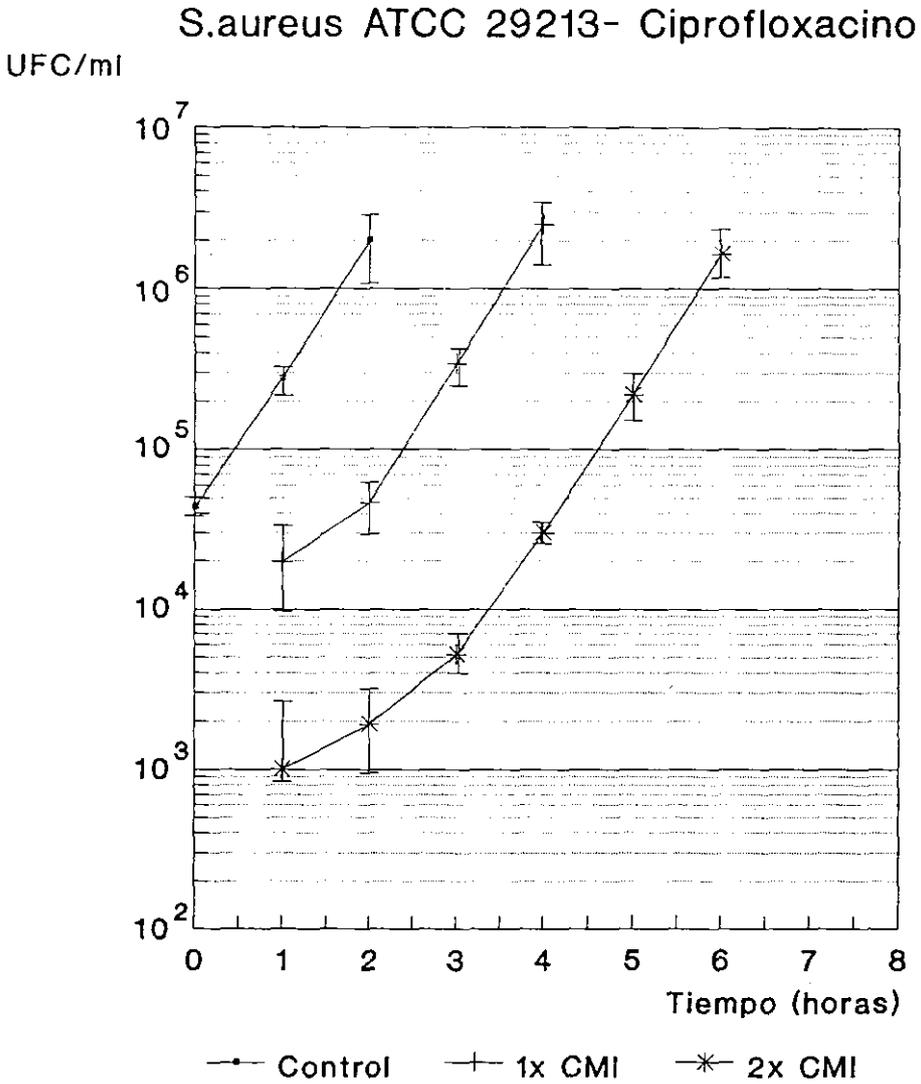


Figura 69.- Efecto de la concentración de ciprofloxacino sobre la duración del EPA. Datos presentados con la media  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales) de 3 experiencias.



Curva recuentos bacterianos-tiempo

Figura 70.- Cinética de crecimiento, monitorizada por recuentos viables, de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 tras una hora de exposición a distintas concentraciones de ciprofloxacino. Datos presentados con la media  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales) de 3 experiencias.

4.4.1.4. S.AUREUS ATCC 29213 - CEFTRIAXONA :  
ENSAYOS DE VALIDACION

Ceftriaxona, con una CMI de 4  $\mu\text{g/ml}$  frente a *S.aureus* ATCC 29213, fue ensayada para ver el EPA de concentraciones iguales y superiores a la CMI ( 2 y 4x CMI ). A estas dosis tuvo una actividad bacteriostática sobre esta cepa patrón, sólo exceptuada por el ligero aumento de la población expuesta a 1x CMI ( **Tabla IX** ).

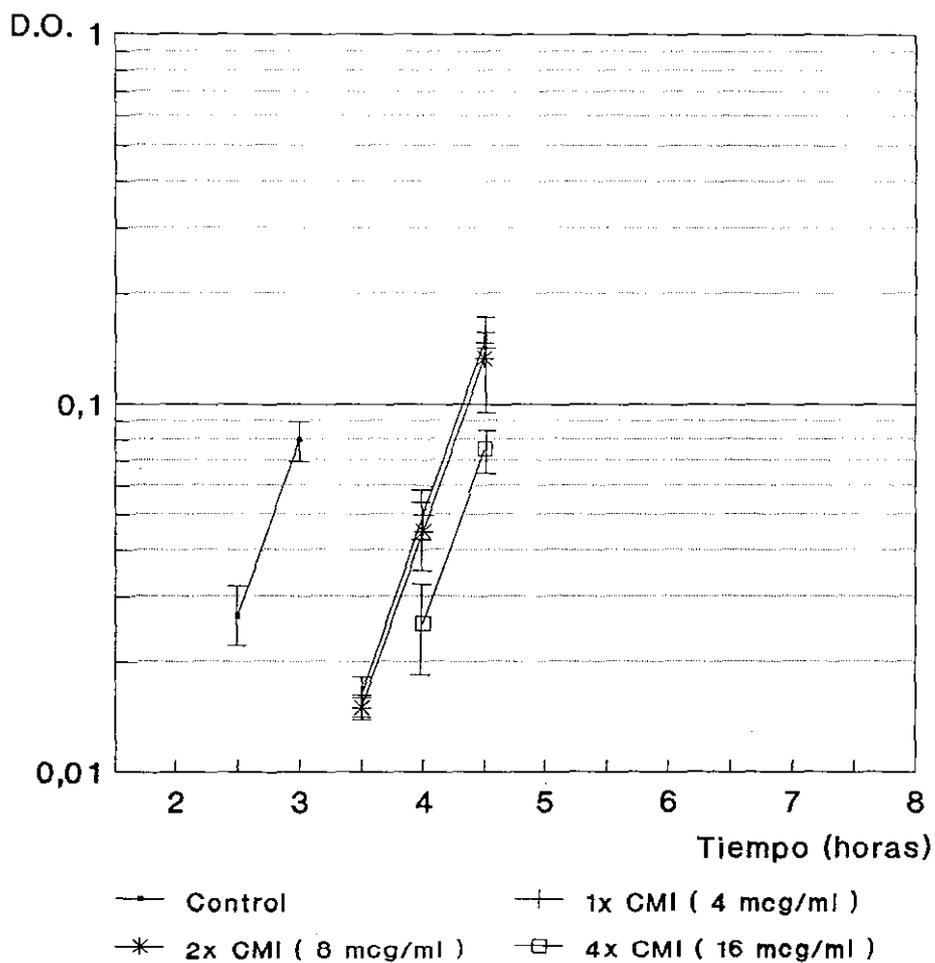
Las curvas de crecimiento de cada cultivo, monitorizadas espectrofotométricamente, aparecen en la **Figura 71**. Todas ellas son paralelas existiendo con respecto al control un tiempo de separación de 72' para el caso de 1x CMI; 75' para 2x CMI y 92' para 4x CMI.

La duración del EPA de ceftriaxona es prácticamente la misma con las concentraciones de 1 y 2x CMI, siendo los valores medios  $\pm$  la desviación estándar de 3 pruebas de  $0,30 \pm 0,10$  hs y de  $0,29 \pm 0,08$  hs respectivamente. Con 4x CMI se apreció un aumento del EPA el cual tuvo en este caso una duración de  $0,51 \pm 0,08$  hs ( **Tabla IX** ).

La **Figura 72** refleja la representación gráfica del EPA ( obtenido por espectrofotometría ) de ceftriaxona frente a esta cepa bacteriana.

La **Figura 73** muestra los recuentos viables en placa resultados en el tiempo tanto del cultivo control como de los tratados. Aplicando la definición clásica del EPA (ecuación 1) la duración del mismo es muy similar a la alcanzada por el método espectrofotométrico siendo de  $0,32 \pm 0,10$  hs con 1x CMI;  $0,31 \pm 0,06$  hs con 2x CMI y  $0,50 \pm 0,08$  hs con 4x CMI ( **Tabla IX** ).

## S.aureus ATCC 29213- Ceftriaxona



Curva densidad óptica-tiempo

Figura 71.- Cinética de crecimiento, monitorizada por espectrofotometría, de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 tras una hora de exposición a distintas concentraciones de ceftriaxona. Datos presentados con la media  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales) de 3 experiencias.

## S.aureus ATCC 29213- Ceftriaxona

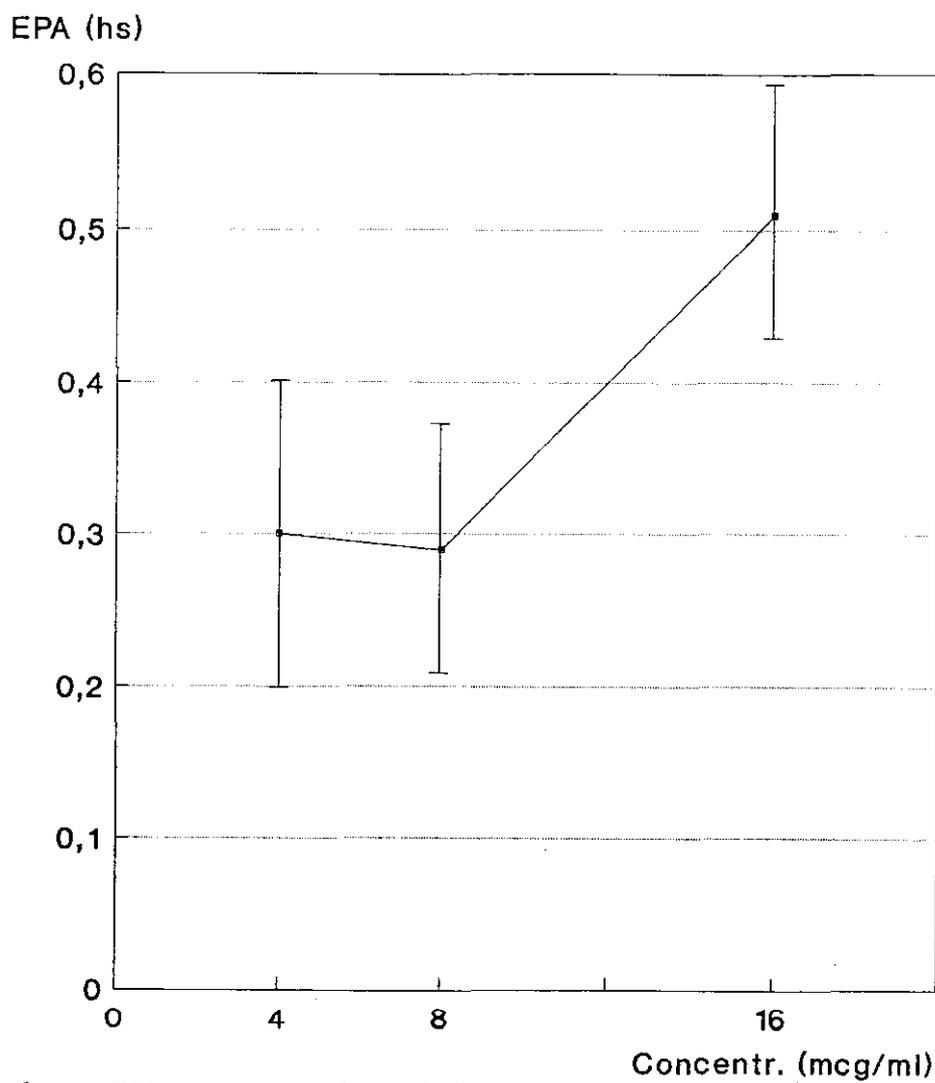
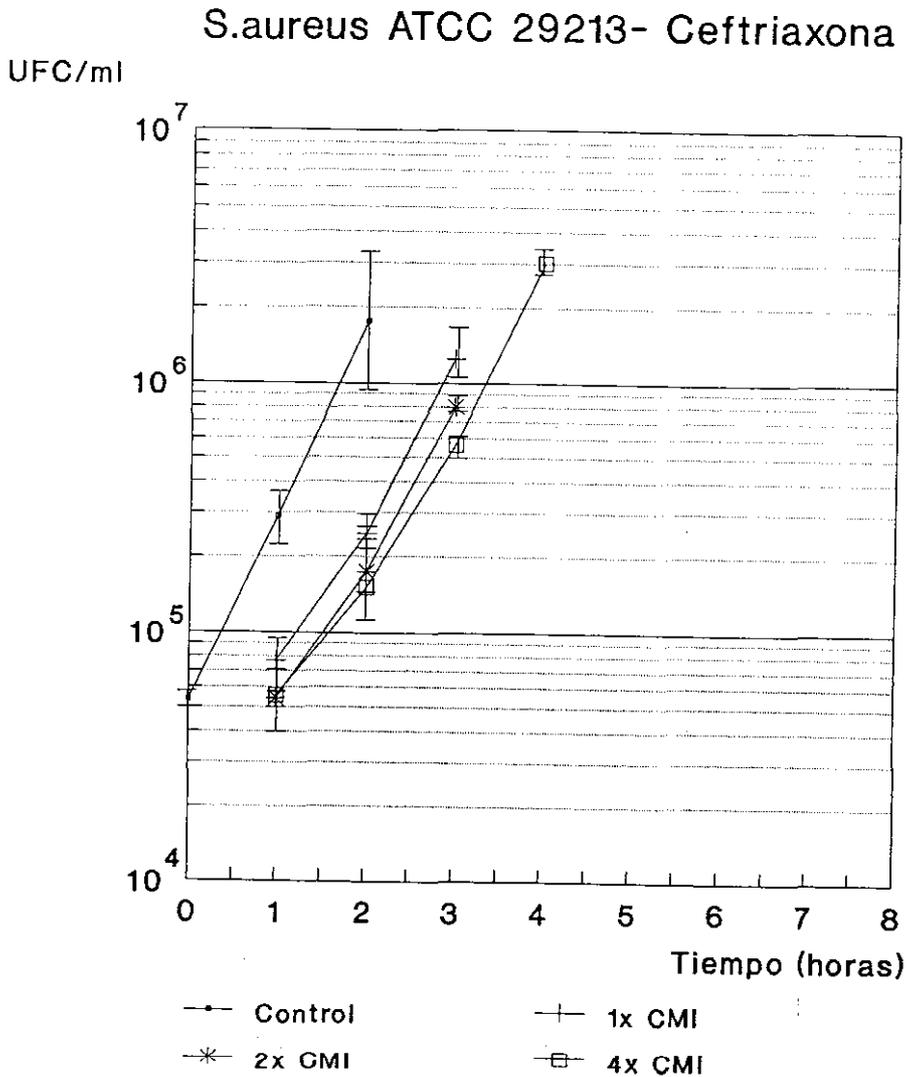


Figura 72.- Efecto de la concentración de ceftriaxona sobre la duración del EPA. Datos presentados con la media  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales) de 3 experiencias.



Curva recuentos bacterianos-tiempo

Figura 73.- Cinética de crecimiento, monitorizada por recuentos viables, de *Stahylococcus aureus* ATCC 29213 tras una hora de exposición a distintas concentraciones de ceftriaxona. Datos presentados con la media  $\pm$  la desviación estándar (barras verticales) de 3 experiencias.

Tabla IX.- Relación entre concentración de la droga (  $\mu\text{g/ml}$  ), actividad bactericida (  $\log_{10} r$  ) y EPA ( h. ), determinado fotométricamente y por recuentos viables, tras una hora de exposición al agente antimicrobiano en *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Concentración de la droga en $\mu\text{g/ml}$ (x CMI)	Disminución del inóculo ( $\log_{10} r$ ) <sup>a</sup>	EPA (h) <sup>a</sup>	
		Fotometría	Recuentos viables
Gentamicina			
0,25 ( 1 )	-0,21 $\pm$ 0,13	0,82 $\pm$ 0,14	0,71 $\pm$ 0,22
0,50 ( 2 )	0,82 $\pm$ 0,65	1,77 $\pm$ 0,14	1,80 $\pm$ 0,20
1,00 ( 4 )	2,91 $\pm$ 0,12	ND	ND
Ciprofloxacino			
0,25 ( 1 )	0,49 $\pm$ 0,35	0,55 $\pm$ 0,10	0,54 $\pm$ 0,11
0,50 ( 2 )	1,68 $\pm$ 0,24	0,65 $\pm$ 0,05	0,70 $\pm$ 0,02
Ceftriaxona			
4 ( 1 )	-0,14 $\pm$ 0,08	0,30 $\pm$ 0,10	0,32 $\pm$ 0,10
8 ( 2 )	0,00 $\pm$ 0,00	0,29 $\pm$ 0,08	0,31 $\pm$ 0,06
16 ( 4 )	0,00 $\pm$ 0,08	0,51 $\pm$ 0,08	0,50 $\pm$ 0,08

<sup>a</sup> Expresado con la media  $\pm$  la desviación estándar.

$$r = N_{\text{inic}} / N_{\text{anti}}$$

ND.- No determinado debido a la alta tasa de lisis celular.

#### 4.4.2. STAPHYLOCOCCUS AUREUS 356

Aislado clínico de los hemocultivos de un paciente con carcinoma hepático y sepsis.

Los agentes antimicrobianos estudiados fueron gentamicina y ciprofloxacino a  $\frac{1}{4}$  ;  $\frac{1}{2}$  ; 1 y 2x CMI y ceftriaxona a 1, 2 y 4x CMI.

Los resultados obtenidos se exponen en la **Tabla X**.

Tabla X.- Relación entre concentración de la droga (  $\mu\text{g/ml}$  ), actividad bactericida (  $\log_{10} r$  ) y EPA ( h. ), determinado fotométricamente, tras una hora de exposición al agente antimicrobiano en *Staphylococcus aureus* 356.

Concentración de la droga en $\mu\text{g/ml}$ (x CMI)	Disminución del inóculo ( $\log_{10} r$ )	EPA (h)
Gentamicina		
0,03 ( 1/4 )	-0,47	0,15
0,06 ( 1/2 )	-0,55	0,25
0,12 ( 1 )	-0,54	0,47
0,25 ( 2 )	0,20	1,67
Ciprofloxacino		
0,06 ( 1/4 )	-0,31	0,13
0,12 ( 1/2 )	-0,18	0,20
0,25 ( 1 )	0,02	0,40
0,50 ( 2 )	0,91	0,80
Ceftriaxona		
2 ( 1 )	-0,33	0,20
4 ( 2 )	-0,17	0,32
8 ( 4 )	-0,02	0,52

$$r = N_{\text{inic}} / N_{\text{anti}}$$

#### 4.4.3. STAPHYLOCOCCUS AUREUS 360

Esta cepa fue aislada en los hemocultivos de un enfermo con sepsis e identificada y congelada, hasta su utilización, con el número 360.

Los agentes antimicrobianos ensayados fueron gentamicina y ciprofloxacino a concentraciones infra y suprainhítorias e igual a la CMI y ceftriaxona a 1, 2 y 4x CMI.

Los resultados obtenidos se exponen en la Tabla XI.

**Tabla XI.-** Relación entre concentración de la droga (  $\mu\text{g/ml}$  ), actividad bactericida (  $\log_{10} r$  ) y EPA ( h.), determinado fotométricamente, tras una hora de exposición al agente antimicrobiano en *Staphylococcus aureus* 360.

Concentración de la droga en $\mu\text{g/ml}$ (x CMI)	Disminución del inóculo ( $\log_{10} r$ )	EPA (h)
Gentamicina		
0,06 ( 1/4 )	-0,58	0,18
0,12 ( 1/2 )	-0,54	0,20
0,25 ( 1 )	-0,31	0,99
0,50 ( 2 )	1,67	2,10
Ciprofloxacino		
0,06 ( 1/4 )	-0,44	0,35
0,12 ( 1/2 )	-0,35	0,35
0,25 ( 1 )	-0,21	0,68
0,50 ( 2 )	0,36	0,98
Ceftriaxona		
2 ( 1 )	-0,33	0,37
4 ( 2 )	-0,20	0,38
8 ( 4 )	-0,15	0,56

$$r = N_{\text{inic}} / N_{\text{anti}}$$

DISCUSSION

## 5.- DISCUSION

El retraso en el crecimiento de las bacterias supervivientes tras la exposición y eliminación de un antibiótico fue descrita hace más de 50 años ( Bigger, 1944 ) sin embargo, el significado clínico de esta observación fue ignorada hasta mediados de los años 70. Actualmente el estudio del EPA está siendo ampliamente tratado favoreciendo el cambio en los regímenes de dosificación de algunos antibióticos como los aminoglucósidos ( Barclay et al., 1994 ); ( Kumana & Yuen, 1994 ); ( Rodman et al., 1994 ); ( Zhanel & Craig, 1994 ).

Para la determinación del EPA " in vitro " necesita sucederse una serie de pasos ordenados como preparación del inóculo bacteriano, exposición al agente antimicrobiano durante un periodo de tiempo fijado por el investigador, eliminación del antibiótico, seguimiento de la cinética de crecimiento de los cultivos control y expuestos y determinación del EPA.

Para la eliminación del antibiótico utilizamos el método de dilución. Hace falta partir de un inóculo de al menos  $10^5$ - $10^6$  UFC/ml, ya que, a la vez que diluimos el antimicrobiano, también se diluye la suspensión bacteriana. Esta técnica, al igual que la de los lavados repetidos, puede aplicarse a todos los antimicrobianos, sin embargo, para antibióticos con rápida actividad bactericida, puede dar lugar a una reducción del número de bacterias viables tal, que caigan por debajo del nivel detectable en el recuento (Craig & Gudmundsson, 1991).

La técnica de lavados repetidos ha sido ampliamente utilizada por investigadores del EPA (Bundtzen et al., 1981); (Bush et al., 1989); (Fursted, 1988); (Gould et al., 1989); (Kitzis et al., 1984); (McDonald et al., 1977); (Parker & Luse, 1948); (Sande et al., 1981); (Winstanley & Hasting, 1989), pero hay que tener en cuenta que puede causar una reducción temporal

de la velocidad de crecimiento del microorganismo (Parker & Marsh, 1946) que puede ser debido al descenso de la temperatura durante la centrifugación, al efecto mecánico de la propia centrifugación e incluso a un mal acceso de los nutrientes del medio al núcleo de la masa bacteriana. Por tanto, es importante cuando se utiliza este método que el cultivo control se vea sometido al mismo procedimiento que el expuesto al antimicrobiano (Craig & Gudmundsson, 1991). Este sistema es aplicable a todos los antibióticos, aunque el proceso de eliminación se prolonga alrededor de 30 minutos.

Se ha demostrado que el método de dilución es adecuado para la eliminación del agente antimicrobiano ( Sección 3.2.4.15. y 3.2.4.16.), teniendo la ventaja respecto a otros, de ser un método rápido, simple y fácil de realizar.

En cuanto al seguimiento de la cinética de crecimiento bacteriano, los distintos métodos que se pueden aplicar van a influir en la determinación del EPA ( MacKenzie & Gould, 1993 ).

Nosotros optamos por la técnica fotométrica. Para ello escogimos tres antibióticos  $\beta$ -lactámicos ( ceftriaxona, piperacilina e imipenem ); un aminoglucósido ( gentamicina ) y una quinolona ( ciprofloxacino ). Cada uno de estos agentes fue probado a concentraciones iguales y superiores a la CMI sobre cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. También se experimentó con concentraciones subinhibitorias, ya que se ha puesto de manifiesto tanto in vitro como in vivo circunstancias que dan a conocer su relevancia médica (Lorian, 1993); (Reyman, 1981); (Zak & Kradolfer, 1979). Elegimos la espectrofotometría por ser una técnica sencilla,

rápida, cómoda y reproducible de determinación del crecimiento bacteriano y del EPA.

Se considera los recuentos viables la técnica estándar de monitorización del crecimiento bacteriano y fue la primera que se utilizó en el estudio del EPA, definiéndolo en base a la ecuación 1 ( Sección 1.1. y 1.4.2.1. ) por tanto, también es el método clásico de determinación del EPA sirviendo de molde de comparación con las nuevas técnicas desarrolladas para el cálculo de dicho efecto. Su mayor inconveniente radica en la laboriosidad de la técnica y en la inexactitud de los resultados cuando existen alteraciones morfológicas de las células expuestas como formación de filamentos o esferoplastos debido a lo cual, han ido incorporándose y aplicándose otras técnicas al estudio del EPA.

Quizás la más extendida sea la bioluminiscencia, cuya metodología de trabajo está bien estandarizada entre los investigadores que la utilizan, aunque existen consideraciones particulares, según los autores, en el nivel de incremento del ATP intracelular necesario para que las curvas de crecimiento del cultivo expuesto (T) y control (C), sometidos ambos al mismo proceso de eliminación del antimicrobiano, sean paralelas, admitiendo que llegado a este punto, se ha terminado el EPA del agente antimicrobiano ensayado. Odenholt et al. (1989) y Odenholt-Tornqvist (1989) consideraron que bastaba un incremento de diez veces (  $1 \log_{10}$  ); Isaksson et al. (1988 y 1991) establecieron dicho nivel en 100 veces (  $2 \log_{10}$  ) y Hanberger et al. (1990 y 1991) en  $3 \log_{10}$  o sea 1000 veces.

Puntos discrepantes entre la determinación del EPA por bioluminiscencia y por recuentos viables lo constituyen los antibióticos  $\beta$ -lactámicos que provocan formación esferoplastos

( carbapenemes ) y los que producen formación de filamentos en bacterias Gram negativas. Ejemplo del primer caso lo constituyen los trabajos de Odenholt et al. (1989); Odenholt-Tornqvist (1989); Hanberger et al. (1993) y MacKenzie et al. (1994) con meropenem y *E.coli* y del segundo, los de Hanberger et al. (1990 y 1991) y MacKenzie & Gould (1993) con ampicilina y *E.coli*.

Estas discordancias se atribuyen, en el caso de los carbapenemes, a que el ATP de las células supervivientes y de algunas muertas, pero todavía intactas, pueden ser registrados por el método de bioluminiscencia (Mattie, 1981); ( Odenholt et al., 1989 ) sin embargo, hay autores que consideran que esta última fuente es de escasa importancia (MacKenzie et al., 1994) y que quizás las discrepancias existentes entre recuentos viables y bioluminiscencia cuando hay formación de esferoplastos sean debidas a su alto contenido de ATP, con sobreestimación tanto del número de células como de la duración del EPA ( Hanberger et al., 1993 ) y cuando hay formación de filamentos, a que la bioluminiscencia no se ve influenciada por la aparición de dichas formas como lo hace los recuentos viables en placa.

También Isaksson et al. ( 1993 ), observaron que el EPA de los aminoglucósidos ensayados ( gentamicina, tobramicina, amikacina y netilmicina ) sobre *S.aureus*, determinado por el método de bioluminiscencia, es mayor que el determinado por recuentos viables. Un gran descenso de viabilidad fue observado por estos autores con este último método después de una hora de exposición a estos agentes lo cual, no fue observado con el método de bioluminiscencia que mostró un incremento de la concentración de ATP en el mismo periodo.

En un estudio previo, fue demostrado mucho mayor descenso de la viabilidad que de ATP intracelular cuando bacterias Gram negativas eran expuestas a los aminoglucósidos ( Isaksson et al., 1988 ).

Estas diferencias se explican porque el método de bioluminiscencia mide directamente el efecto del antibiótico sobre la suspensión bacteriana detectando el ATP intracelular. Los recuentos viables, miden indirectamente lo que está ocurriendo en el caldo de cultivo cuando la bacteria es inoculada en las placas de agar e incubada toda la noche para recuento. Es probable que el daño de la bacteria se recupere más fácilmente en caldo que en medio sólido (Isaksson et al., 1993).

MacKenzie et al. ( 1994 ) en un estudio con meropenem y miembros de la familia Enterobacteriaceae, comparan el EPA alcanzado utilizando 5 métodos para monitorizar el crecimiento bacteriano. El EPA obtenido cuando se utilizaba la técnica morfológica fue el de mayor duración seguido por la técnica de bioluminiscencia sólo, bioluminiscencia en combinación con impedancia, recuentos viables en combinación con impedancia y recuentos viables sólo. Estas dos últimas técnicas demostraban en algunos casos EPA negativos.

Aunque la impedancia es un método automático y exacto de monitorización del recuento bacteriano (Richards et al., 1978); para utilizarla en la determinación del EPA, debe cuantificarse por otro método el número de bacterias que entran en el sistema por lo que, los resultados se ven influidos por los mismos factores que inciden en el método empleado para efectuar el recuento inicial ( MacKenzie et al., 1994 ).

Baquero y cols. en 1986 y Gould et al. en 1989 y 1991, aplicaron este método al estudio del EPA.

Uno de los problemas que presenta este sistema es que se ve notablemente influenciado por la formación de filamentos (Baquero y cols, 1986); (Gould et al., 1989). Otro problema es el que atañe al umbral de sensibilidad del aparato medidor de impedancia el cual, no detecta crecimiento bacteriano por debajo de  $10^5$  UFC/ml.

Diferencias en cuanto a duración del EPA cuando se define en base a la regresión de las alteraciones morfológicas que algunos antibióticos producen en algunas bacterias, ya fueron puestas de manifiesto por Lorian et al. en 1989 ( utilizando una quinolona y un  $\beta$ -lactámico sobre *E.coli* ), cuando compararon el EPA morfológico con el clásico de recuentos viables siendo mayor, en los dos casos, el EPA obtenido por el primer método.

Guan et al. (1992) llegan más lejos comparando el EPA clásico, con el EPA definido por las alteraciones en la síntesis del ADN y del ARN cuando una cepa de *E.coli* era expuesta a distintas quinolonas, sugiriendo que la definición clásica del EPA, da unos valores inferiores al tiempo de recuperación de *E.coli* a estos agentes.

Un filamento bacteriano se forma cuando una bacteria con forma bacilar crece y se multiplica pero no se separa en nuevas células bacterianas individuales. Este filamento contiene varios genomas en un citoplasma común (Lorian et al., 1985).

La formación de filamentos tras la exposición a ciertos  $\beta$ -lactámicos se explica por la inhibición de la proteína ligadora de penicilina (PBP) 3 de bacilos Gram negativos (Lorian &

Gemmell, 1991), previniendo la separación de los bacilos formados recientemente. El mecanismo de filamentación de las quinolonas es desconocido.

Algunos autores han estudiado el efecto que sobre la morfología bacteriana tienen determinados antimicrobianos (Klein & Luginbuhl, 1977); (Comber et al., 1977); (Zimmerman & Stapley, 1976); (Hanberger et al., 1990 y 1991); (Holbrook et al., 1989).

Lorian et al. en 1989, utilizaron un microscopio de contraste de fase para seguir los cambios de la morfología bacteriana de *E.coli* después de haber sido expuesta durante 5 horas a ciprofloxacino y ampicilina a  $\frac{1}{2}$  x CMI. Esta exposición dió lugar a una marcada formación de filamentos (  $\geq 15\mu\text{m}$  de longitud ). El EPA morfológico lo definieron como el tiempo necesario para que, una vez que se ha eliminado el antibiótico, la población de filamentos de bacilos gram negativos que se han formado se recupere y constituyan un 10%, siendo el 90% restante bacilos normales. De esta manera obtuvieron un EPA de 3 horas con ampicilina y de 4 horas con ciprofloxacino, mientras que con el método de recuentos bacterianos en agar no se obtenía EPA con ampicilina y era de 2 horas para ciprofloxacino.

Guan et al. (1992), estudiaron el EPA de concentraciones subinhibitorias de tres quinolonas frente a *E.coli* observando los cambios que estos agentes antimicrobianos imprimen en las células tratadas. Estos cambios son consecuencia de la actuación de las quinolonas sobre la girasa del ADN lo cual, se traduce en la aparición de células filamentosas en las que se observa un gran nucleoide en mitad de la célula. Esto sugiere la existencia de una inhibición de la segregación del nucleoide y una alteración en la división y septación celular. Demostraron que el efecto de

estas quinolonas sobre la morfología bacteriana era más prolongado en el tiempo que la supresión del crecimiento de dichas células y por tanto, que el EPA morfológico era mayor que el obtenido por recuentos viables.

Como desventajas de este método está el hecho de que sólo es útil en la determinación del EPA de agentes antimicrobianos que producen alteraciones morfológicas en las bacterias expuestas, así como también su gran laboriosidad, ya que obliga a permanecer un tiempo considerable realizando recuentos en el microscopio.

Hay otros sistemas de determinación del EPA que sí muestran una alta correlación con el método estándar de recuentos viables.

Es el caso del trabajo de Gottfredsson et al. (1991), cuando utilizan la medida del CO<sub>2</sub> generado por la bacteria para efectuar el seguimiento del crecimiento bacteriano, adaptando el sistema de hemocultivos BACTEC. En su análisis determinaron el EPA provocado en *S.aureus* por dicloxacilina, vancomicina, rifampicina, gentamicina y ciprofloxacino y el observado en *E.coli* tras la exposición a ampicilina, gentamicina y ciprofloxacino.

El EPA era calculado por la ecuación  $EPA = T - C$  donde T, es el tiempo requerido para que la producción de CO<sub>2</sub> del organismo expuesto alcance un valor de crecimiento de 30 ( después que se ha procedido a la eliminación del antibiótico ) y C, lo mismo pero aplicado al cultivo control ( sometido al mismo proceso de exclusión de la droga ).

El mayor inconveniente de este método es cuando se prueba una droga que induce largos EPAs o exhibe una rápida actividad bactericida, en ambos casos la generación de CO<sub>2</sub> puede no ser medible hasta pasadas 8-10 horas después de la eliminación del antibiótico, incluso utilizando un valor de crecimiento más bajo (cutoff). En contrapartida tiene como ventajas el ser un método simple y relativamente poco caro de determinación del EPA.

Gottfredsson et al. (1989) aplicaron el método radiométrico al estudio del EPA (determinando la tasa de incorporación de <sup>3</sup>H-timidina por la bacteria expuesta) y lo compararon con el método de referencia. Para ello utilizaron cinco antibióticos y las cepas patrones de *S.aureus* y *E.coli*, obteniendo una alta correlación con los resultados conseguidos por recuentos viables.

Tampoco Nadler et al. (1989), refirieron diferencia estadísticamente significativa entre el EPA obtenido por el método electrónico por ellos aplicado y el alcanzado por recuentos viables en placa.

Diseñaron una experiencia para determinar el EPA de oxacilina sobre *S.aureus*, utilizando un Biodetector que contaba electrónicamente las células con un diámetro de 0,5 a 1,5  $\mu$ m en poblaciones bacterianas en crecimiento activo. El EPA lo calculaban por comparación del tiempo requerido para que los recuentos de la población no expuesta y la expuesta, se incrementen 10 veces tras la eliminación del antibiótico.

Sin embargo el método electrónico, al igual que el clásico, se ve influido por la formación de filamentos, ya que, después de la eliminación de la droga ocurre una rápida septación,

incrementandose las UFCs y los contajes electrónicos, enmascarando de esa manera el EPA (Nadler et al., 1989). Otro inconveniente de esta técnica viene dado por formación de tapones por las suspensiones bacterianas dificultando los contajes, siendo imprescindible la limpieza escrupulosa del aparato (Carlberg, 1986). Tampoco se pueden utilizar suspensiones bacterianas que excedan de  $10^8$  UFC/ml porque se daría el fenómeno de coincidencia, o sea, dos o más bacterias podrían entrar simultáneamente por la abertura siendo contadas como una sola, lo que obligaría a diluir el cultivo (Carlberg, 1986).

Como ventajas del método reseñar el hecho de que se pueden analizar varias combinaciones droga-organismo rápida y comodamente en un mismo día (Nadler et al., 1989).

Otra de las técnicas empleadas en el seguimiento de la cinética de crecimiento bacterianos es la espectrofotometría la cual, también ha sido aplicada al estudio del EPA ( Bergan et al. 1980 ).

Ravizzola et al. (1983) y Rescott et al. (1988) utilizaron el sistema espectrofotométrico Abbott MS-2 para la determinación del EPA, calculándolo en base al tiempo requerido para que disminuya un 5% la transmitancia del cultivo expuesto al antibiótico ( una vez que se a eliminado el antibiótico), menos el tiempo requerido para que haga lo mismo la transmitancia del cultivo control. Con este método estos últimos autores encontraron un paralelismo entre el descenso del 5% de la transmitancia del cultivo y el contaje de colonias en el rango de  $5 \times 10^6$  a  $4 \times 10^7$  UFC/ml.

Li et al. (1993), en un estudio del EPA de tres antibióticos  $\beta$ -lactámicos ( penicilina G, amoxicilina y amdinocilina ) sobre *E.coli* ATCC 25922, emplearon también el sistema Abbott MS-2 y concluyeron que con el método espectrofotométrico se obtenía el mismo EPA que con el método clásico en estas bacterias aunque, puntualizaron que esto es así cuando el antibiótico presenta un corto o nulo EPA.

Odenholt-Tornqvist (1993), utilizando un BioScreen C para medir la densidad óptica del cultivo, ensayaron meropenem sobre *P.aeruginosa* ATCC 27853 y *E.coli* ATCC 25922, observando unos valores de EPA negativos o muy bajos tanto por el método de recuentos viables como por la técnica espectrofotométrica.

A fin de soslayar los problemas de sensibilidad de la técnica espectrofotométrica Meng et al.(I) en 1991, propusieron el estudio del EPA cuantificándolo sobre la base del tiempo medio de recuperación de la población bacteriana expuesta al antimicrobiano. Consideraron que el término "supresión del crecimiento" era ambiguo, ya que puede referirse al tiempo en que la células observadas empiezan a crecer, o al tiempo en que dichas células ( o su progenie ) comienzan a crecer con velocidad normal. Para evitar esta ambigüedad adoptaron el término de "tiempo medio de aparición ( o recuperación )" referido al tiempo medio requerido por una progenie individual en aparecer en la subpoblación. Definen una función,  $F^*(t)$ , como la fracción de la población total que se ha formado desde 0 a un tiempo  $t$ .

El EPA es cuantificado en base a la diferencia entre el tiempo de recuperación medio del cultivo tratado y el del cultivo control asumiendo que ambos tienen igual densidad de población a tiempo 0. De esta forma, el EPA está representado por el área

que queda entre la curva de crecimiento normalizada del cultivo tratado y la del cultivo control, en una gráfica que represente en el eje de abscisas el tiempo y en el de ordenadas la función  $F'(t)$ .

Para validar esta técnica, Meng et al. II ( 1991 ) estudiaron el EPA de ciprofloxacino sobre *E.coli* ATCC 25922 comparando su método con el clásico de recuentos viables, no encontrando diferencias estadísticamente significativas entre ambos.

Al comparar en nuestro estudio, los resultados del EPA obtenido espectrofotométricamente con los alcanzados por recuentos viables en placa ( aplicando en este último caso la deficiencia clásica del EPA ), utilizando el test de la t de Student para muestras apareadas, no obtuvimos diferencias estadísticamente significativas (  $p > 0,05$  ) en ningún caso, por lo que se aceptó la Hipótesis Nula (  $H_0$  ).

La duración del EPA de gentamicina sobre las cepas patrones analizadas con nuestro método espectrofotométrico, fue mayor que la observada por Gottfredsson et al. en 1993 y 1995 utilizando los recuentos viables en placa para la determinación del EPA.

Sin embargo, nuestros resultados con ciprofloxacino son peores que los obtenidos por estos mismos autores en 1995 y por Minguez y cols. en 1991.

En cuanto a imipenem, el único  $\beta$ -lactámico de los estudiados que muestra tener EPA; las observaciones realizadas por nosotros coinciden tanto en la cepa patrón de *E.coli* como en la de *P.aeruginosa*, con los resultados emitidos utilizando los recuentos viables en placa por Fantin et al. (1991); Gottfredsson

et al. (1995) y Nadler et al. (1989). Estos últimos autores, detectan una falta de reproducción de los resultados del EPA de imipenem y la cepa patrón de *P.aeruginosa* ATCC 27853.

La técnica espectrofotométrica por nosotros descrita, tiene la ventaja respecto al método estándar, de ser más rápida y reproducible; además de que permite estudiar varias asociaciones el mismo día.

Excepto en la combinación de gentamicina a  $\frac{1}{4}$  (0,06  $\mu\text{g/ml}$ ) y  $\frac{1}{2}$ x CMI con *E.coli* 304, que deparó un EPA de 35 minutos y en la de gentamicina a  $\frac{1}{2}$ x CMI ( 0,25  $\mu\text{g/ml}$  ) con *E.coli* 347, en la que se observó un EPA de 33 minutos de duración, las concentraciones subinhibitorias ensayadas de este agente sobre los aislados clínicos de hemocultivos de *P.aeruginosa* y *S.aureus* y de ciprofloxacino sobre estas cepas de *E.coli*, *P.aeruginosa* y *S.aureus*, no mostraron EPAs significativos siendo, en cualquier caso, menor de 30 minutos.

Estas apreciaciones coinciden con las de Guan & Burnham (1992), al admitir que ninguna de las quinolonas por ellos probadas, mostró EPA ni efecto bactericida cuando se ensayaba a estas concentraciones frente a *E.coli* ATCC 25922 utilizando los recuentos viables y la definición clásica del EPA.

Tampoco Zhanel et al. en 1992, estudiando la actividad antimicrobiana de concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacino frente a cepas mucoides y no mucoides de *P.aeruginosa*, observaron un EPA apreciable por el método de referencia después de dos horas de contacto con el antibiótico, aunque sí era algo más amplio el periodo de recuperación de la

bacteria tras la exposición al antibiótico que el detectado por nosotros, porque también lo era el tiempo de contacto.

En cuanto a la actividad antimicrobiana de concentraciones subinhibitorias de aminoglucósidos frente a varias cepas de *P.aeruginosa*, Zhanel et al. (1991) demostraron, valiéndose de los recuentos viables en agar, que a  $\frac{1}{4}$  x CMI los tres aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina y amikacina) exhibían un EPA similar, de 10 a 15 minutos de duración y a  $\frac{1}{2}$  x CMI, un EPA de 40 minutos. La duración del contacto era de dos horas.

En la determinación del EPA tras la exposición bacteriana a determinados antibióticos que producen alteraciones morfológicas, pueden producirse artefactos.

Las dianas celulares de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son las enzimas que catalizan la síntesis del peptidoglicano de la pared celular. Estas proteínas corresponden a las PBP ( Proteínas Fijadoras de Penicilina ), las cuales catalizan las reacciones de transpeptidasa y transglicosilasa del peptidoglicano ( Bryan & Godfrey, 1991 ).

La inhibición de las PBPs 1A y 1B por los  $\beta$ -lactámicos conlleva a la lisis celular ( Kato et al., 1985 ). La inhibición de la PBP 2 resulta en la formación de células esféricas mientras que la inhibición de la PBP 3 lleva a la formación de filamentos ( Spencer et al., 1987 ). Las PBPs 4, 5, 6 y 7 se considera que no son esenciales para la bacteria ( Spratt & Pardee, 1975 ) aunque, hay trabajos ( Tuomanen & Schwartz, 1987 ) que sugieren que al menos la PBP 7 puede ser una diana letal implicada en la lisis de células de *E.coli* que no estén dividiéndose.

Las células bacterianas expuestas a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos pueden responder de una de las siguientes 4 maneras: (a) la célula puede lisarse; (b) puede morir y luego lisarse; (c) puede morir sin que se evidencie lisis o (d) puede sobrevivir a la exposición. El camino tomado está influenciado por el estado del sistema autolítico de la bacteria, por el índice de crecimiento y por el estado nutricional del organismo. Un sistema autolítico ausente o que se exprese pobremente es el mayor contribuidor a la tolerancia ( Tomasz A., 1979 ); ( McDowell & Reed, 1989 ).

Las alteraciones morfológicas que estos antibióticos imprimen en la célula inducen cambios en la duración del EPA, según la metodología utilizada para la determinación, si tales artefactos no son corregidos.

Nos referimos principalmente a que cuando la cinética de crecimiento se determina por recuentos viables en agar, se asume que un genoma bacteriano corresponde a una UFC; sin embargo, algunos agentes antimicrobianos como ciertos  $\beta$ -lactámicos y quinolonas alteran la morfología del bacilo gram negativo induciendo la formación de filamentos, cada filamento contiene varios genomas en un citoplasma común, cuando estos filamentos se emplazan sobre el agar, producen una sola colonia como un bacilo normal (Lorian et al., 1989). Un filamento puede contener una biomasa de hasta 20 bacterias, siendo medido como una UFC/ml cuando se realizan contajes viables ( Hanberger et al., 1990 ). Esto da lugar a una sobrevaloración del efecto bactericida de la droga, lo cual, repercute en el EPA, infraestimándolo.

Aquellos métodos de determinación del EPA que necesiten realizar un recuento viable tras la exposición al antibiótico,

para ver el efecto bactericida del mismo ( aunque posteriormente el seguimiento del crecimiento bacteriano del cultivo control y tratados se realice con otra técnica ), se ven afectados de igual manera por estas alteraciones morfológicas. Esto ocurre por ej. con la impedancia ( Hanberger et al., 1991 ); ( MacKenzie et al., 1994 ) y con nuestro método espectrofotométrico.

El caso más evidente lo constituyen los antibióticos  $\beta$ -lactámicos con alta afinidad a la proteína ligadora de penicilina (PBP) 3, los cuales causan formación de filamentos en las bacterias gram negativas ya que esta PBP es esencial en la formación de septos (Kahan et al., 1983). Si el método utilizado en la determinación del EPA de estos agentes son los recuentos viables obtenemos EPAs negativos (Bundtzen et al., 1981); (Bustamante et al., 1984); (Mínguez y cols., 1989); (Hanberger et al., 1990); (Craig & Gudmundsson, 1991) ya que estos filamentos tras la eliminación del antimicrobiano, comienzan a dividirse en bacilos Gram negativos corrientes, causando más rápido incremento en las UFC de los cultivos expuestos que en los controles (Rolinson et al., 1977).

La rápida septación de los filamentos después de la eliminación de la droga afecta también a la determinación del EPA cuando se emplea la medida de la conductancia en el seguimiento de la cinética de crecimiento de los cultivos bacterianos. Esta rápida septación induce un aumento desmesurado tanto de los recuentos viables como de los contajes electrónicos (Baquero y cols., 1986); ( Nadler et al., 1989 ), causando EPAs negativos cuando en realidad son nulos.

Kroeker et al. ( 1995 ), realizan unas recomendaciones para el cálculo del EPA de antibióticos  $\beta$ -lactámicos sobre bacilos

Gram negativos, basándose en experimentos hechos con la cepa de referencia de *P.aeruginosa* ATCC 27853 y ceftazidima (añadida durante dos horas al cultivo). En la primera hora tras la eliminación del antibiótico, observaron que el  $t_g$  representaba una imposibilidad fisiológica. Vieron que había formación de filamentos. Este corto  $t_g$  era debido a la fragmentación de los filamentos. Ellos corregían este artefacto dibujando la curva de crecimiento del cultivo control y del expuesto, extrapolando en esta última la parte de la curva que no demuestra crecimiento convencional a una nueva intercepción a tiempo 0, que se aproxime más a la forma convencional de curva de crecimiento de un cultivo expuesto a un antibiótico.

Nosotros lo corregimos realizando tras la eliminación del antibiótico  $\beta$ -lactámico, los recuentos al microscopio óptico de las condensaciones de ADN de las bacterias del cultivo control y de los expuestos, multiplicando los recuentos bacterianos obtenidos por cada factor de corrección. Nuestra metodología no se ve afectada por la rápida septación de la bacteria ya que, debido al dintel de sensibilidad de la técnica espectrofotométrica, no se detectaba crecimiento de los cultivos hasta pasadas dos horas desde la eliminación del antibiótico, tiempo en que ya existía un predominio de bacilos Gram negativos normales.

Según Meng et al. (1991), la formación de filamentos es improbable que repercuta significativamente en la cuantificación del EPA por el "método del tiempo de recuperación", propuesto por ellos, utilizando la técnica espectrofotométrica en el seguimiento de los cultivos.

También Hanberger et al. ( 1990 y 1991 ) aseguran que el crecimiento bacteriano monitorizado por bioluminiscencia, no se acelera como consecuencia de la septación de los filamentos.

Otra alteración morfológica de las bacterias expuestas, que incide en la determinación del EPA, es la producida por los carbapenemes ( imipenem y meropenem ) en los bacilos Gram negativos. Estos  $\beta$ -lactámicos se unen preferentemente a la PBP 2 de los bacilos Gram negativos (Hashizume et al., 1984); (Majcherczyk & Livermore, 1990) y causan formación de esferoplastos y células con morfología aberrante, produciendo crecimientos dificultosos de la bacteria en placas de agar, con descensos pronunciados de la viabilidad (Hanberger et al., 1991); esto es debido probablemente a la lisis de esferoplastos en las placas de agar, lo cual provoca una sobreestimación del efecto bactericida y produce EPAs falsamente negativos ( MacKenzie et al., 1994 ).

La formación de esferoplastos sin embargo, provocan cambios de signo contrario cuando se utiliza la bioluminiscencia para seguir el crecimiento bacteriano de los cultivos, ya que los grandes esferoplastos pueden tener un alto contenido de ATP ( probablemente debido al aumento de volumen ), provocando una sobreestimación tanto del número de células como de la duración del EPA ( Hanberger et al., 1993 ) por este método.

Esto evidencia que la incapacidad para crecer no implica necesariamente muerte bacteriana; la bacteria puede sobrevivir y sintetizar ATP aunque no sea capaz de formar colonias en placas de agar ( Sörén et al., 1995 ).

Cuando en los experimentos se usa un medio de cultivo con baja osmolaridad (50 mosM/litro), no se forman esferoplastos y hay una relación estrecha entre viabilidad y ATP intracelular (Hörnsten et al., 1989).

Nuestros resultados con imipenem y *E.coli* ATCC 25922, concuerdan con los obtenidos por Hanberger et al. (1993) cuando utilizan los recuentos viables en la determinación del EPA de este agente antibacteriano ( 0,2 horas ), pero son inferiores a los obtenidos por estos mismos autores cuando aplicaban la bioluminiscencia a la determinación del EPA ( 3,7 horas ), o la microscopía ( 2,4 horas ). El contacto con el antibiótico duró en todos estos casos dos horas.

También fue inferior el valor de EPA de ciprofloxacino y *E.coli* en nuestro caso, respecto al detectado por Lorian et al. (1989) con las técnica morfológica, sin embargo, esta última técnica tiene la desventaja de estar limitada a antibióticos que producen alteraciones microscópicas de la morfología bacteriana (  $\beta$ -lactámicos y quinolonas ).

La falta de EPA manifestada en nuestros resultados de imipenem sobre *E.coli*, expuesta durante una hora a este agente, no fue demostrada por Baquero y cols. (1986) usando la monitorización por impedancia. Esta falta de EPA es probablemente debido al uso de bajas concentraciones de imipenem y al demasiado corto tiempo de exposición ( Hanberger et al., 1993 ).

La determinación del EPA por monitorización de los cambios de impedancia de los cultivos bacterianos necesita, al igual que el método espectrofotométrico descrito, un recuento en placa antes y después de la exposición al antibiótico sin embargo,

nuestra instrumentación es más simple. Tampoco en nuestro caso se ha demostrado que las formas bacilares alteren la exactitud de la medición como lo hace la impedancia (Baquero y cols., 1986).

Respecto a la combinación imipenem con *P.aeruginosa* ATCC 27853, resultados superiores a los nuestros obtuvieron Odenholt et al. (1989) y Hanberger et al. (1991) con bioluminiscencia. Existen problemas con esta técnica cuando se forman esferoplastos.

También se detectan desigualdades entre nuestros resultados y los reconocidos por Isaksson et al. (1993), con el método de bioluminiscencia, en la determinación del EPA de aminoglucósidos frente a *S.aureus*; siendo mucho mayor el EPA observado por estos investigadores que el determinado por nosotros por el método espectrofotométrico. Estas discrepancias han sido también puestas de manifiesto frente a la técnica de recuentos viables en placa, detectándose un significativo efecto bactericida inicial, que no fue observado con el método de bioluminiscencia el cual, mostró un incremento de la concentración de ATP intracelular en el mismo periodo. Para explicar estas diferencias se habla de descenso de viabilidad de las células por recuentos viables y también de que la medida de ATP sería poco exacta en estos casos ya que se realiza tanto de las células vivas como de las muertas (MacKenzie & Gould, 1993).

El EPA de gentamicina sobre *E.coli* y *S.aureus* demostrado en nuestro estudio, fue mayor que el señalado por Gottfredsson et al. (1991) utilizando la técnica de detección de la generación de CO<sub>2</sub> por la bacteria, estos autores detectaron incluso valores de EPA negativos en la combinación de gentamicina con *E.coli*. En cambio, la asociación con ciprofloxacino obtuvo un EPA superior

al nuestro con las dos bacterias. El principal inconveniente de este método es su bajo dintel de sensibilidad para detectar crecimiento bacteriano, evidenciado principalmente cuando el antibiótico tiene un amplio EPA sobre la bacteria o exhibe un gran efecto bactericida. En estos casos el experimento se prolonga bastantes horas.

Cuando se compara, para determinar el EPA, el método espectrofotométrico usado en este estudio, con el de contaje electrónico utilizado por Nadler et al. (1989), este último presenta una clara desventaja ya que es mucho más laborioso y complejo que el nuestro y no es aplicable a un amplio número de determinaciones (  $\beta$ -lactámicos que se unen preferentemente a la PBP 3 de bacilos Gram negativos ).

Li et al. (1993) propone la aplicación del método espectrofotométrico sólo con antibióticos que tengan un mínimo o nulo EPA sobre las bacterias ensayadas. Esta aseveración contrasta con nuestros resultados y los indicados por Meng et al. (1991) y Rescott et al. (1988) utilizando la técnica espectrofotométrica.

El impacto de los protocolos de administración sobre la eficacia antibacteriana no sólo depende del fármaco en cuestión y de sus parámetros farmacocinéticos, sino también de su farmacodinamia y, en último término, de su mecanismo de acción (Gerber, 1988). En general, los antibióticos son más activos frente a bacterias de crecimiento rápido, esto es particularmente cierto con los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, a los cuales son altamente sensibles las células en crecimiento logarítmico, no siendo afectadas si se exponen en la fase estacionaria de

crecimiento. Los aminoglucósidos sin embargo, son activos durante todas las fases de crecimiento (Daikos, 1991).

Debido al desconocimiento existente respecto de la función que realiza el EPA "in vivo", se están utilizando modelos animales (Gerber et al., 1983); (Roosendaal et al., 1985); (Mordenti et al., 1985); (Craig, 1993) y en menor proporción, ensayos con humanos (Bodey et al., 1979); (Lagast et al., 1983); (Feld et al., 1984) para su estudio.

Los regímenes de dosificación intermitentes pueden ser tan eficaces como la dosificación continua para aquellas combinaciones droga-organismo que exhiben un prolongado EPA, ya que éste puede prevenir el crecimiento de las bacterias después que los niveles del fármaco caen por debajo de su CMI. Una dosificación continua o más frecuente puede ser necesaria cuando hay una falta de EPA en la combinación anteriormente citada (Vogelman et al., 1988); (Gerber et al., 1982).

La actividad de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos se debe a la presencia constante de droga ( Gerber et al., 1983); (Leggett et al., 1989); (Roosendaal et al., 1986) ; (Vogelman et al., 1988) más que a la concentración pico de la misma en suero, como ocurre en el caso de los antibióticos aminoglucósidos (Gerber et al., 1989); (Moore et al., 1984); (Leggett et al., 1989); ( Craig et al., 1991); ( Gilbert, 1991); ( Powell et al., 1983); ( McCormack & Schentag, 1987); ( Gerber et al., 1982).

El mayor inconveniente de los modelos que utilizan animales pequeños es la rápida cinética de eliminación que tienen todos los antibióticos en estos seres, por todo ello Gerber (1988), propone realizar una adaptación de dichos esquemas al ser humano

y lo logra inyectando al animal el fármaco en estudio en fracciones decrecientes a intervalos de 15-20 minutos.

Bakker-Woudenberg et al. en 1984 no observaron diferencias entre la infusión continua y la dosificación intermitente (cada 12 hs.) de penicilina G en un modelo de neumonía neumocócica en ratas normales, sin embargo, en ratas con fallos en la fagocitosis, el regimen de dosificación continúa, fue marcadamente más efectivo. Esto nos pone de manifiesto que en condiciones "in vivo", para programar un régimen de dosificación, no sólo ha de tenerse en cuenta los factores relacionados con el fármaco antes mencionados, sino también otros de la defensa del huésped a la infección.

Respecto a la terapia con aminoglucósidos, los estudios realizados en humanos por algunos autores referentes a netilmicina (Van der Auwera, 1988 y 1991); (Tulkens et al., 1988); (Hollender et al., 1989); (Hansen et al., 1988); (Sturm, 1989); (Muijsken et al., 1988); (Schwarz, 1988) sugieren que el protocolo de administración de la misma dosis total, administrada una sola vez al día, es tan eficaz como el convencional de dosis múltiples, ofreciendo una tendencia a la reducción de la nefrotoxicidad (Hansen et al., 1988); (Tulkens et al., 1988). A las mismas conclusiones llegaron Powell et al. (1983); Nicolau et al. (1995) y Elhanan et al. en 1995 (en niños), estudiando otros aminoglucósidos.

El significado clínico del EPA atañe a cuanto se refiere a la dosificación de los antimicrobianos. Puede ser posible administrar drogas que inducen EPA con unos intervalos más largos entre dosis sin perder eficacia, reduciendo costes y toxicidad. Las drogas que no inducen EPA necesitan una administración más

frecuente a fin de que las concentraciones en el plasma estén constantemente por encima de su CMI (Vogelman et al., 1988). Actualmente este tema es una puerta abierta a nuevas investigaciones, que definan con mayor precisión el papel que juega el EPA en la relación antibiótico, bacteria y huésped.

CONCLUSIONES

## 6.- CONCLUSIONES

1.- El crecimiento logarítmico de la bacteria es detectado de forma precisa por el método espectrofotométrico.

2.- El método espectrofotométrico es menos laborioso que los recuentos viables en agar para realizar el seguimiento de la cinética de crecimiento de los cultivos.

3.- La técnica espectrofotométrica ha demostrado ser válida para la determinación del efecto postantibiótico.

4.- Se puso de manifiesto la existencia de EPA en las tres cepas patrones cuando se enfrentaron a gentamicina a las concentraciones estudiadas. Ciprofloxacino tuvo EPA sobre las cepas patrones de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. A excepción de la unión imipenem - *P.aeruginosa*; ninguna de las restantes combinaciones entre antibióticos  $\beta$ -lactámicos y cepas controles reportó EPA ( considerando que no existe EPA cuando su duración es menor de 30 minutos ).

5.- El comportamiento de gentamicina, ciprofloxacino, ceftriaxona e imipenem frente a los seis aislados clínicos ensayados, fue similar al observado en las cepas patrones, aunque se evidenció características particulares diferenciadoras en las uniones de imipenem con *Escherichia coli* 347 y gentamicina y ciprofloxacino con *P.aeruginosa* 251 y 276.

6.- En los casos en los que se evidenció la existencia de EPA, la duración de éste iba paralela a la concentración de antimicrobiano añadida al cultivo bacteriano. Al aumentar la concentración antimicrobiana, aumenta la duración del EPA en todas las cepas bacterianas y con todos los antimicrobianos analizados.

7.- Las concentraciones subinhibitorias, estudiadas solamente en gentamicina y ciprofloxacino, no mostraron EPA sobre los aislados clínicos de *E.coli*, *P.aeruginosa* y *S.aureus* ensayados. Sólo la unión gentamicina - *E.coli* 304 y 347, exhibió un ligero EPA a concentraciones por debajo de la CMI ( 35 y 33 minutos respectivamente ).

8.- La alteración morfológica característica que imprimió la exposición a ceftriaxona y piperacilina de *E.coli* y *P.aeruginosa* fue la formación de filamentos. Dichos filamentos contienen varios genomas en un citoplasma común. El tamaño del filamento y su número de genomas aumentó con la concentración del  $\beta$ -lactámico.

9.- El contacto con imipenem de *E.coli* y *P.aeruginosa* indujo la formación de esferoplastos y células con formas aberrantes. Estas alteraciones resultaron ser osmóticamente muy frágiles cuando se produjeron en *P.aeruginosa*.

10.- Se puso de manifiesto discrepancias entre recuentos viables en agar y número de células con algunos antibióticos  $\beta$ -lactámicos; así sucedió cuando se ensayó ceftriaxona y piperacilina sobre *E.coli* y ceftriaxona e imipenem sobre *P.aeruginosa*. Estas diferencias afectan de igual manera a la determinación del EPA por el método clásico y por el método espectrofotométrico por nosotros propuesto y fueron debidas a las alteraciones morfológicas que estos agentes antimicrobianos imprimieron en los microorganismos citados, desapareciendo cuando dichas alteraciones fueron corregidas.

11.- No se demostraron diferencias estadísticamente significativas (  $p > 0,05$  ), en la determinación del EPA de los distintos antibióticos frente a las cepas patrones, entre el método espectrofotométrico descrito y el de recuentos viables.

**BIBLIOGRAFIA**

## 7.- BIBLIOGRAFIA

ALARCON T., JIMENEZ M.L. and LOPEZ-BREA M. 1990. Post-antibiotic effect of different antimicrobial agents against *Haemophilus influenzae* strains. Rev. Esp. Quimioterap. 3:271-274.

BAKKER-WOUDENBERG I.A.J.M., VAN DEN BERG J.C., FONTIJNE P. and MICHEL M.F. 1984. Efficacy of continuous versus intermittent administration of penicillin G in *Streptococcus pneumoniae* pneumonia in normal and immunodeficient rats. Eur. J. Clin. Microbiol. 3: 131-135.

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

BARCLAY M.L., BEGG E.J. and HICKLING K.G. 1994. What is the evidence for once-daily aminoglycoside therapy ?. Clin. Pharmacokinet. 27: 32-48.

BARZA M. 1978. A critique of animal models in antibiotic research. Scand. J. Infect. Dis., Suppl. 14: 109-117.

BAYER A.R., SPEERT D.P., PARK S., TU J., WITT M., NAST C.C. and NORMAN D.C. 1991. Functional role of mucoid exopolysaccharide (alginate) in antibiotic-induced and polymorphonuclear leukocyte-mediated killing of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 59: 302-308.

BEGGS W.H. and JENNE J.W. 1969. Isoniazid uptake and growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* in relation to time and concentration of pulsed drug exposures. Tubercle. 50: 377-385.

BERGAN T and CARLSEN I.B. 1980. Bacterial kill rates of amoxycillin and ampicillin at exponentially diminishing concentrations simulating in vivo conditions. *Infection* 8: S103-S108.

BERGAN T., CARLSEN I.B. and FUGLESANG J.E. 1980. An in vitro model for monitoring bacterial responses to antibiotic agents under simulated in vivo conditions. *Infection* 8: S96-S102.

BIGGER J.W. 1944. The bactericidal action of penicillin on *Staphylococcus pyogenes*. *Irish J. Med. Sci., Sixth Series*, 227: 533-568.

BLASER J. and LÜTHY R. 1988. Comparative study on antagonistic effects of low pH and cation supplementation on in vitro activity of quinolones and aminoglycosides against *P.aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 22: 15-22.

BLASER J., STONE B.B., GRONER M.C. and ZINNER S.H. 1985. Impact of netilmicin regimens on the activities of ceftazidime-netilmicin combinations against *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro pharmacokinetic model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28: 64-68.

BODEY G.P., KETCHEL S.J. and RODRIGUEZ V.A. 1979. A randomized study of carbenicillin plus cefamandole or tobramycin in the treatment of febrile episodes in cancer patients. *Am. J. Med.* 67: 608-616.

BRYAN L.E. and GODFREY A.J. 1991.  $\beta$ -lactam antibiotics: mode of action and bacterial resistance, p. 599-664. En: Lorian V. (ed.) *Antibiotics in laboratory*, 3rd ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

BUNDTZEN R.W., GERBER A.U., COHN D.L. AND CRAIG W.A. 1981. Postantibiotic suppression of bacterial growth. *Rev. Infect. Dis.* 3:28-37.

BUSH L.M., BOSCIA J.A., WENDELER M., PITSAKIS P.G. and KAYE D. 1989. In vitro postantibiotic effect of daptomycin (LY146032) against *Enterococcus faecalis* and methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 33: 1198-1200.

BUSTAMANTE C.I., DRUSANO G.L., TATEM B.A. and STANDIFORD H.C. 1984. Postantibiotic effect of imipenem on *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26: 678-682.

CARLBERG D.M. 1986. Determining the effects of antibiotics on bacterial growth by optical and electrical methods, p. 64-92. En: Lorian V. (ed.) *Antibiotics in laboratory medicine*, 2nd ed. Willians & Wilkins, Baltimore.

CARS O. and ODENHOLT-TORNQVIST I. 1993. The post-antibiotic sub-MIC effect in vitro and in vivo. *J. Antimicrob. Chemother.* 31 ( Suppl. D ): 159-166.

CHIN N. X. and NEU H. C. 1987. Postantibiotic suppressive effect of ciprofloxacin against gram positive and gram negative bacteria. *Am. J. Med.*; 82 (Suppl 4A): 58-62.

CHIN N.X., NOVELLI A. and NEU H.C. 1988. In vitro activity of lomefloxacin (SC-47111; NY-198) a difluoroquinolone 3-carboxylic acid, compared with those of other quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 656-662.

COMBER K.R., BOON R.J. and SUTHERLAND R. 1977. Comparative effects of amoxycillin and ampicillin on the morphology of

*Escherichia coli* in vivo and correlation with activity. Antimicrob. Agents Chemother. 12: 736.

COULTAS M.K., HUTCHISON D.J. 1962. Metabolism of resistant mutants of *Streptococcus faecalis*; IV. Use of a Biophotometer in growth curve studies. J. Bacteriol. 84:393-401.

CRAIG W.A. 1991. The postantibiotic effect. Clin.Microbiol. Newsletter. 13: 121-124.

CRAIG W.A. 1993. Post-antibiotic effects in experimental infection models: relationship to in-vitro phenomena and to treatment of infections in man. J. Antimicrob. Chemother. 31 ( Suppl. D ): 149-158.

CRAIG W.A. and GUDMUNDSSON S. 1986. The postantibiotic effect, p. 515-536. En: Lorian V. (ed.) Antibiotics in laboratory medicine, 2nd ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

CRAIG W.A. and GUDMUNDSSON S. 1991. Postantibiotic effect, p. 403-431. En: Lorian V. (ed.) Antibiotics in laboratory, 3rd ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

CRAIG W.A., LEGGETT J., TOTSUKA K. and VOGELMAN B. 1988. Key pharmacokinetic parameters of antibiotic efficacy in experimental animal infections. J. Drug. Dev. 1 (Suppl. 3): 7-15.

CRAIG W.A. and MATTIE H. 1986. Postantibiotic effect (PAE) with *Bacteroides fragilis* (Abstract). In: Program and Abstracts of the 26th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology. New Orleans, p. 122.

CRAIG W.A., REDINGTON J. and EBERT S.C. 1991. Pharmacodynamics of amikacin in vitro and in mouse thigh and lung infections. J. Antimicrob. Chemother. 27 (Suppl. C): 29-40.

CRAIG W.A. and VOGELMAN B. 1987. The postantibiotic effect. Ann Intern. Med. 106: 900-902.

DAIKOS G. K. 1991. Continuous versus discontinuous antibiotic therapy: the role of the post-antibiotic effect and other factors. J. Antimicrob. Chemother. 27: 157-160.

DAVIDSON R. J., ZHANEL G. G. and HOBAN D. J. 1991. Human serum enhances the postantibiotic effect of fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 1261-1263.

DAVIS B.D., DULBECCO R., EISEN H.N., GINSBERG H.S. 1984. Nutrición y crecimiento bacterianos, p. 50-60. En: Tratado de Microbiología 3ª ed. Salvat Editores S.A., Barcelona.

D'EUSTACHIO A.J. and JOHNSON D.R. 1968. Adenosine triphosphate content of bacteria. Federation Proceedings 27: 761.

DELLA BRUNA C., JABES D., ROSSI R., YOUNES G. and CASTELLANI P. 1989. FCE 22101 and FCE 22891: in-vitro antibacterial activity at concentrations simulating human plasma levels following intravenous, intramuscular and oral administration. J. Antimicrob. Chemother. 23 (Suppl.C): 119-128.

DORNBUSCH K., HENNING C. and LINDEN B. 1989. In Vitro activity of the new penems FCE 22101 and FCE 24362 alone or in combination with aminoglycosides against streptococci isolated from patients with endocarditis. J. Antimicrobial. Chemother. 23 (Suppl.C): 109-117.

DRABU Y.J. and BLAKEMORE P.H. 1991. The post-antibiotic effect of teicoplanin: monotherapy and combination studies. *J. Antimicrob. Chemother.* 27 (Suppl.B): 1-7.

DUBOIS J. and ST.-PIERRE C. 1989. The post-antibiotic effect (PAE) of lomefloxacin against *Legionella pneumophila* and *Pseudomonas maltophilia*. En Programs and Abstracts of the Twenty-Ninth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Abstract 938. American Society for Microbiology. Washington D.C., p. 258.

DUGUID J.P. 1989. Staining methods, p.38-63. En: Mackie & McCartney (eds.) *Practical Medical Microbiology*, Thirteenth ed. vol. 2. Churchill Livingstone, N.Y.

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

EAGLE H. AND MUSSELMAN A. D. 1949. The slow recovery of bacteria from the toxic effects of penicillin. *J. Bacteriol.* 58: 475-490.

EBERT S.C., LEGGETT J., VOGELMAN B. and CRAIG W.A. 1988. Evidence for a slow elimination phase for penicillin G. *J. Infect. Dis.* 158: 200-202.

ELHANAN K., SIPLOVICH L. and RAZ R. 1995. Gentamicin once-daily versus thrice-daily in children. *J. Antimicrob. Chemother.* 35: 327-332.

ESPINOZA A.M., CHIN N.X., NOVELLI A. and NEU H.C. 1988. Comparative in vitro activity of a new fluorinated 4-quinolone, T-3262 (A-60969). *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 663-670.

FANTIN B., EBERT S., LEGGETT J., VOGELMAN B. and CRAIG W. A. 1990. Factors affecting duration of in-vivo postantibiotic effect for aminoglycosides against Gram-negative bacilli. J. Antimicrob. Chemother. 27: 829-836.

FANTIN B., LEGGETT J., EBERT S. and CRAIG W. A. 1991. Correlation between in vitro and in vivo activity of antimicrobial agents against gram negative bacilli in a murine infection model. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 1413-1422.

FELD R., RACHLIS A., TUFFNELL P.G., DUNCAN I., MORAN L., PINFOLD P. and DeBOER G. 1984. Empiric therapy for infections in patients with granulocytopenia. Continuous v. interrupted infusion of tobramycin plus cefamandole. Arch. Intern. Med. 144: 1005-1010.

FINEGOLD S.M. and BARON E.J. 1989. Métodos ópticos para el diagnóstico de laboratorio de las enfermedades infecciosas p. 105-117. En: Bailey & Scott Diagnóstico Microbiológico 7ª ed. Editorial Médica Panamericana S.A., Buenos Aires.

FORSGREN A. 1984. Antimicrobial agents and host defence. Scand. J. Infect. Dis., Suppl. 43: 24-33.

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

FUURSTED K. 1987. Comparison of the postantibiotic effect of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* with ampicillin alone or combined with streptomycin: Studies on a novel type of antimicrobial interaction. Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. 95: 351-354.

FUURSTED K. 1988. Comparative killing activity and postantibiotic effect of streptomycin combined with ampicillin, ciprofloxacin, imipenem, piperacillin or vancomycin against strains of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium*. Chemotherapy 34: 229-234.

FUURSTED K. 1989. Further studies on post-antibiotic effect and synergism in two strains of *Streptococcus faecalis*. APMIS 97: 33-37.

GALL L.S. and CURBY W.A. 1980. Instrumented Systems for Microbiological Analysis of Body Fluids. CRC Press, Boca Raton, Fla.

GARETH MORRIS J. 1990. The metabolism, growth and death of bacteria, p. 40-70. En: Principles of bacteriology, virology and immunity; eighth ed. vol 1, Topley & Wilson's.

GERBER A. V. 1988. Comparison of once-daily versus thrice-daily human equivalent dosing of aminoglycosides: basic considerations and experimental approach. J. Drug Dev. 1 (Suppl.3): 17-23.

GERBER A.U., BRUGGER H.P., FELLER C., STRITZKO T. and STALDER B. 1986. Antibiotic therapy of infections due to *Pseudomonas aeruginosa* in normal and granulocytopenic mice: comparison of murine and human pharmacokinetics. J. Infect. Dis. 153: 90-97.

GERBER A.U. and CRAIG W.A. 1981. Growth kinetics of respiratory pathogens after short exposures to ampicillin and erythromycin in vitro. J. Antimicrob. Chemother. 8 (Suppl.C): 81-91.

GERBER A.U., CRAIG W.A., BRUGGER H.P., FELLER C., VASTOLA A.P. and BRANDEL J. 1983. Impact of dosing intervals on activity of gentamicin and ticarcillin against *Pseudomonas aeruginosa* in granulocytopenic mice. J. Infect. Dis. 147: 910-917.

GERBER A.U. and FELLER-SEGESSENMANN C. 1985. In-vivo assessment of in-vitro killing patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Chemother. 15 (Suppl.A): 201-206.

GERBER A.U., KOZAK S., SEGESSENMANN C., FLÜCKIGER U., BANGERTER T. and GRETER U. 1989. Once-daily versus thrice-daily administration of netilmicin in combination therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a man-adapted neutropenic animal model. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 8: 233-237.

GERBER A.U., WIPRACHTIGER P., STETTLER-SPICHIGER U. and LEBEK G. 1982. Constant infusions vs. intermittent doses of gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. J. Infect. Dis. 145: 554-560.

GERRARD H.N., PARKER M.S. and PORTER G.S. (1961). The effect of pipetting on the concentration of homogeneous spore suspensions. Part II. J. Pharm. London, 13: 405.

GILBERT D.N. 1991. Once-daily aminoglycoside therapy. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 399-405.

GOLDSCHMIDT M.C. and WHEELER T.G. 1975. Determination of bacterial cell concentrations in urine specimens by electrical measurements, p. 6-11. En: Schlessinger D. (ed.) Microbiology. American Society for Microbiology, Washington D.C.

GOTTFREDSSON M., ERLENDSDOTTIR H. and GUDMUNDSSON S. 1991. Quantitation of postantibiotic effect by measuring CO<sub>2</sub> generation

of bacteria with the BACTEC blood culture system. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 2658-2661.

GOTTFREDSSON M., ERLENDSDOTTIR H., GUDMUNDSSON A. and GUDMUNDSSON S. 1989. DNA synthesis in *S.aureus* y *E.coli* during the postantibiotic effect (PAE) phase. En Programs and Abstracts of the Twenty-Ninth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Abstract 935. American Society for Microbiology. Washington D.C., p. 258.

GOTTFREDSSON M., ERLENDSDOTTIR H., GUDMUNDSSON A. and GUDMUNDSSON S. 1995. Different patterns of bacterial DNA synthesis during postantibiotic effect. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39 : 1314-1319.

GOTTFREDSSON M., ERLENDSDOTTIR H., KOLKA R. and GUDMUNDSSON S. 1991. Metabolic and ultrastructural effects induced by ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus* during the postantibiotic effect phase. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 74: 124-128.

GOTTFREDSSON M., ERLENDSDOTTIR H., KOLKA R. and GUDMUNDSSON S. 1993. Ultrastructural alterations of bacteria during the postantibiotic effect. *Chemotherapy* 39: 153-162.

GOULD I.M., JASON A.C. and MILNE K. 1989. Use of the malthus microbial growth analyzer to study the postantibiotic effect of antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 24: 523-531.

GOULD I.M., MILNE K., HARVEY G. and JASON C. 1991. Ionic binding, adaptative resistance and post-antibiotic effect of netilmicin and ciprofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* 27: 741-748.

GRASSO S., MEINARDI G., DE CARNERI I. and TAMASSIA V. 1978. New in vitro model to study the effect of antibiotic

concentration and rate of elimination on antibacterial activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13: 570-576.

GUAN L., BLUMENTHAL R.M. and BURNHAM J.C. 1992. Analysis of macromolecular biosynthesis to define the quinolone-induced postantibiotic effect in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 2118-2124.

GUAN L., BREINES D. and BURNHAM J.C. 1992. Postantibiotic effect of CI-960, enoxacin, and ciprofloxacin: effects on nucleoid morphology in *Escherichia coli*. En Program and Abstracts of the 32nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Abstract 537. American Society for Microbiology. California, p. 200.

GUAN L. and BURNHAM J.C. 1992. Postantibiotic effect of CI-960, enoxacin, and ciprofloxacin on *Escherichia coli*: effect on morphology and haemolysin activity. *J. Antimicrob. Chemother.* 29: 529-538.

GUDMUNDSSON S and ERLENDSDOTTIR H. 1988. The impact of drug combinations on the postantibiotic effect (PAE). En Program and Abstracts of the Twenty-Eighth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Abstract 773. American Society for Microbiology. Los Angeles, p. 246.

GUDMUNDSSON A., ERLENDSDOTTIR H., GOTTFREDSSON M and GUDMUNDSSON S. 1991. Impact of pH and cationic supplementation on in vitro postantibiotic effect. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 2617-1624.

GUDMUNDSSON S., VOGELMAN B. and CRAIG W. A. 1986. The in-vivo postantibiotic effect of imipenem and other new antimicrobials. *J. Antimicrob. Chemother.* 18 (Suppl E): 67-73.

GÜRDAL H., TULUNAY F. C. and ALTAY G. 1990. Post antibiotic effect of ofloxacin and the activity of Mg<sup>++</sup>. J. Antimicrob. Chemother. 26: 291-292.

HANBERGER H. 1992. Pharmacodynamic effects of antibiotics. Studies on bacterial morphology, initial killing, postantibiotic effect and effective regrowth time. Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 81: 1-52.

HANBERGER H., NILSSON L.E., KIHSTRÖM E. and MALLER R. 1990. Postantibiotic effect of  $\beta$ -Lactam antibiotics on *Escherichia coli* evaluated by bioluminescence assay of bacterial ATP. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 102-106.

HANBERGER H., NILSSON L. E., MALLER R. and ISAKSSON B. 1991. Pharmacodynamics of daptomycin and vancomycin on *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* demonstrated by studies of initial killing and postantibiotic effect and influence of Ca<sup>2+</sup> and albumin on these drugs. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 1710-1716.

HANBERGER H., NILSSON L.E., NILSSON M. and MALLER R. 1991. Post-antibiotic effect of beta-lactam antibiotics on Gram-negative bacteria in relation to morphology, initial killing and MIC. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 10: 927-934.

HANBERGER H., NILSSON L.E., SVENSSON E. and MALLER R. 1991. Synergic post-antibiotic effect of mecillinam, in combination with other  $\beta$ -lactam antibiotics in relation to morphology and initial killing. J. Antimicrob. Chemother. 28: 523-532.

HANBERGER H., SVENSSON E., NILSSON M., NILSSON L.E., HÖRNSTEN E.G. and MALLER R. 1993. Effects of imipenem on *Escherichia coli* studied using bioluminescence, viable counting and microscopy. J. Antimicrob. Chemother. 31: 245-260.

HANSEN M., ACHEN F., CARSTENSEN C., COOLIDGE J., DAHLAGER J., PRIMODT-MOLLER N., KJAERGAARD E., LARSEN H., WILKENSCHILDT M., ZADOR G. and HIPPE E. 1988. Posología de una y tres veces al día comparadas de netilmicina en pacientes febriles inmunodeprimidos: estudio aleatorio y controlado de eficacia e inocuidad. *J. Drug Dev.* 1 (Suppl.3): 119-124.

HARDER W., KUENEN J. G., MATIN A. 1977. A review: microbial selection in continuous culture. *J. Appl. Bacteriol.* 43: 1-24.

HASHIZUME T., ISHINO F., NAKAGAWA J., TAMAKI S. and MATSUHASHI M. 1984. Studies of the mechanism of action of imipenem (N-formimidoylthienamycin) in vitro: binding to the penicillin-binding proteins (PBPs) in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and inhibition of enzyme activities due to the PBPs in *E.coli*. *J. Antibiotics (Tokyo)* 38: 394-400.

HERSHEY A. D., BRONFENBRENNER J. 1938. Factors limiting bacterial growth; III. Cell size and "physiological youth" in *Bacterium coli* cultures. *J. Gen. Physiol.* 21: 721-728.

HESSEN M. T., PITSAKIS P. G. and LEVINSON M. E. 1988. Absence of a postantibiotic effect in experimental *Pseudomonas* endocarditis treated with imipenem, with or without gentamicin. *J. Infect. Dis.* 158: 542-548.

HESSEN M. T., PITSAKIS P. G. and LEVINSON M. E. 1989. Postantibiotic effect of penicillin plus gentamicin versus *Enterococcus faecalis* in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 608-611.

HOLBROOK W.P., KRISTINSSON K.G., CARLEY A.J. and GUNNARSDOTTIR S. 1989. Cultural and electronmicroscopic studies of the effect of penicillin on tolerant oral streptococci. *J. Med. Microbiol.* 30: 267-272.

HOLLENDER L.F., BAHNINI J., De MANZINI N., LAU W.Y., FAN S.T., HERMANSYUR K., BENNY P., HUSNI A.N., SUTJIPTO and LORBER R.R. 1989. A multicentric study of netilmicin once daily versus thrice daily in patients with appendicitis and other intra-abdominal infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 23: 773-783.

HÖRNSTEN B.G., NILSSON L.E., ELWING H. and LINDSTRÖM I. 1989. Effects of *Escherichia coli* spheroplast formation on assays of H<sub>2</sub> and adenosine triphosphate based ampicillin susceptibility test. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 12: 171-175.

HOWARD B.M.A., PINNEY R.J. and SMITH J.T. 1993. Contributions of post-antibiotic lag and repair-recovery to the post-antibiotic effects of ciprofloxacin on *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. *Chemotherapy* 39: 22-31.

INGERMAN M.J., PITSAKIS P.G., ROSENBERG A.F. and LEVISON M.E. 1986. The importance of pharmacodynamics in determining the dosing interval in therapy for experimental *Pseudomonas* endocarditis in the rat. *J. Infect. Dis.* 153: 707-714.

ISAKSSON B., HANBERGER H., MALLER R., NILSSON L.E. and NILSSON M. 1991. Sinergistic post-antibiotic effect of amikacin and  $\beta$ -lactam antibiotics on *Enterococcus faecalis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 27 (Suppl.C): 9-14.

ISAKSSON B., MALLER R., NILSSON L.E. and NILSSON M. 1993. Postantibiotic effect of aminoglycosides on staphylococci. *J. Antimicrob. Chemother.* 32: 215-222.

ISAKSSON B., NILSSON L.E., MALLER R. and SÖREN L. 1988. Postantibiotic effect of aminoglycosides on Gram-negative bacteria evaluated by a new method. *J. Antimicrob. Chemother.* 22: 23-33.

JASON A.C., MACKENZIE F.M., JASON D. and GOULD I.M. 1994. Automatic procedures for measuring post-antibiotic effect and determining random errors. *J. Antimicrob. Chemother.* 34: 669-678.

KAHAN F.M., KROPP M., SUNDELOF J.G. and BIRNBAUM J. 1983. Thienamycin: development of imipenem-cilastin. *J. Antimicrob. Chemother.* 12 (Suppl.D): 1-35.

KARLOWSKY J.A., ZHANEL G.G., DAVIDSON R.J., ZIEROTH S.R. and HOBAN D.J. 1993. In vitro postantibiotic effects following multiple exposures of cefotaxime, ciprofloxacin, and gentamicin against *Escherichia coli* in pooled human cerebrospinal fluid and Mueller-Hinton broth. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:1154-1157.

KATO J.I., SUZUKI H. and HIROTA Y. 1985. Dispensability of either penicillin-binding protein 1a or 1b involved in the essential process for cell elongation in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 200: 272-277.

KAVANAGH F. 1963. Elements of photometric assaying, p. 141-217. En: Kavanagh H (ed.) *Analytical Microbiology*. Academic Press, Indiana.

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

KLEIN R.D. and LUGINBUHL G.H. 1977. Ampicillin induced morphological alterations of *Haemophilus influenzae* type b. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11: 559-592.

KOCH A. L. 1970. Turbidity measurements of bacterial cultures in some available commercial instruments. *Anal. Biochem.* 38: 252-259.

KOCH A.L. 1981. Growth measurement, p: 179-207. En: Gerhardt P. (ed.) Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Microbiology, Washington D.C.

KOCH A.E. and BURCHALL J.J. 1971. Reversal of the antimicrobial activity of trimethoprim by thymidine in commercially prepared media. Appl. Microbiol. 22: 812-817.

KOCH A.L. and EHRENFELD E. 1968. The size and shape of bacteria by light scattering measurements. Biochim. Biophys. Acta 165: 262-273.

KROEKER J.S., KARLOWSKY J.A. and ZHANEL G.G. 1995. Recommendations for the calculation of the post-antibiotic effect for  $\beta$ -lactams and Gram-negative bacilli. J. Antimicrob. Chemother. 35: 551-552.

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

KUMANA C.R. and YUEN K.Y. 1994. Parenteral aminoglycoside therapy. Selection, administration and monitoring. Drugs 47: 902-913.

LAGAST H., MEUNIER-CARPENTIER F. and KLASTERSKY J. 1983. Treatment of gram-negative bacillary septicemia with cefoperazone. Eur. J. Clin. Microbiol. 2: 554-558.

LEE C., BLASER J. and LUTHY R. 1982. Post antibiotic effect (PAE) is markedly influenced by shaking conditions during exposure to antibiotic concentrations. En Program and Abstracts of the Twenty-second Interscience Conference on Antimicrobial

Agents and Chemotherapy, Abstract 383. American Society for Microbiology. Washington D.C., p. 133.

LEGGETT J., FANTIN B., EBERT S., TOTSUKA K., VOGELMAN B., CALAME W., MATTIE H. and CRAIG W.A. 1989. Comparative antibiotic dose-effect relations at several dosing intervals in murine pneumonitis and thigh-infection models. *J. Infect. Dis.* 159: 281-292.

LI R.C., NIX D.E. and SCHENTAG J.J. 1993. New turbidimetric assay for quantitation of viable bacterial densities. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 371-374.

LONGSWORTH L.G. 1936. The estimation of bacterial populations with the aid of a photoelectric densitometer. *J. Bacteriol.* 32: 307-328.

LORIAN V. 1993. Medical relevance of low concentrations of antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 31 ( Suppl.D ): 137-148.

LORIAN V and ATKINSON B. 1978. Effect of serum on Gram-positive cocci grown in the presence of penicillin. *J. Infect. Dis.* 138: 865-871.

LORIAN V., ERNST J. and AMARAL L. 1989. The post-antibiotic effect defined by bacterial morphology. *J. Antimicrob. Chemother.* 23: 485-491.

LORIAN V. and GEMMELL C.G. 1991. Effect of low antibiotic concentrations on bacteria: effects on ultrastructure, virulence and susceptibility to immunodefenses, p.493-555. En: Lorian V. (ed.) *Antibiotics in laboratory*, 3rd ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

LORIAN V., JOYCE D.M. and KIM Y. 1985. Ultrastructure and reversion of bacterial filaments produced with ciprofloxacin. En Recent Advances in Chemotherapy- Antimicrobial Section 2, Proceedings of the 14th International Congress of Chemotherapy Kyoto, 1985 (Ishigami J.,Ed.), pp. 1545-6. University of Tokyo Press, Tokyo.

MackENZIE F.M. and GOULD I.M. 1993. The post-antibiotic effect. J. Antimicrob. Chemother. 32: 519-537.

MackENZIE F.M., GOULD I.M., CHAPMAN D.G. and JASON D. 1994. Comparison of methodologies used in assessing the postantibiotic effect. J. Antimicrob. Chemother. 34: 223-230.

MackENZIE F.M., GOULD I.M., CHAPMAN D.G. and JASON D. 1994. Postantibiotic effect of meropenem on members of the family *Enterobacteriaceae* determined by five methods. Antimicrob. Agents Chemother. 38: 2583-2589.

MAJCHERCZYK P.A. and LIVERMORE D.M. 1990. Penicillin-binding Protein (PBP) 2 and the post-antibiotic effect of carbapenems. J. Antimicrob. Chemother. 26: 593-594.

MALLETTE M.F. 1969. Evaluation of growth by physical and chemical means p: 521-566. En: Norris J.R. & Ribbons D.W. ( eds.) Methods in Microbiology, vol. 1. Academic Press, N.Y.

MATTIE H. 1981. Kinetics of antimicrobial action. Rev. Infect. Dis. 3: 19-27.

McCARTHY and SENNE. 1980. Evaluation of acridine orange stain for detection of microorganisms in blood cultures. J. Clin. Microbiol. 11: 281-285.

MCCORMACK J.P. and SCHENTAG J.J. 1987. Potential impact of quantitative susceptibility test on the design of aminoglycoside dosing regimens. *Drug Intelligence and Clinical Pharmacy* 21: 187-192.

MCDONALD P.J., CRAIG W.A. and KUNIN C.M. 1976. Brief antibiotic exposure and effect on bacterial growth, p. 95-102. En: Williams & Geddes (eds.) *Chemotherapy*, vol.2. Plenum, New York.

MCDONALD P. J., CRAIG W. A., KUNIN C. M. 1977. Persistent effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* after exposure for limited periods of time. *J. Infect. Dis.* 135: 217-223.

MCDONALD P.J., WETHERALL B.L. and PRUUL H. 1981. Postantibiotic leukocyte enhancement: increased susceptibility of bacteria pretreated with antibiotics to activity of leukocytes. *Rev. Infect. Dis.* 3: 38-44.

MCDOWELL T.D. and REED K.E. 1989. Mechanism of penicillin killing in the absence of bacterial lysis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1680-1685.

MENG X., NIGHTINGALE C.H., SWEENEY K.R. 1991. Quantification of in-vitro post-antibiotic effect based on the mean recovery-time.I: Theoretical perspectives and practical procedure. *J. Antimicrob. Chemother.* 28: 505-514.

MENG X., NIGHTINGALE C.H., SWEENEY K.R. 1991. Quantification of in-vitro post-antibiotic effect based on the mean recovery-time.II: A comparison of colony counting versus photometric methods for determination of bacterial growth. *J. Antimicrob. Chemother.* 28: 515-521.

MENG X., NIGHTINGALE C.H., SWEENEY K.R. and QUINTILIANI R. 1992. Loss of bactericidal activity of quinolones (Q) in the presence of postantibiotic effect (PAE) induced by rifampin (R). En Program and Abstracts of the 32nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Abstract 539. American Society for Microbiology. California, p. 200.

MEYNELL G.G. and MEYNELL B. 1970. Bacterial growth, p.1-34. En: Theory and practice in experimental bacteriology, second edition. Cambridge University Press, London.

MINGUEZ F., CORRALES I., GOMEZ-LUS M. L., LURUEÑA S. y PRIETO J. 1989. Valoración del efecto postantibiótico de cinco grupos de antimicrobianos sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Rev. Esp. Quimioterap. 11: 161-165.

MINGUEZ F., GOMEZ-LUS M.L., MURO A., CABRONERO M.J. GOMIS M. and PRIETO J. 1989. Comparative study of the postantibiotic effect of cefotaxime, amoxicillin, ofloxacin and pefloxacin. Rev. Infect. Dis. 11: S955-S957.

MINGUEZ F., RAMOS C., BARRIENTOS S., LOSCOS A. and PRIETO J. 1991. Postantibiotic effect of ciprofloxacin compared with that of five other quinolones. Chemotherapy 37: 420-425.

MINGUEZ F., RAMOS C., BARRIENTOS S., LURUEÑA S. and LOSCOS A. 1990. Influencia de diversos factores sobre el efecto postantibiótico y la actividad antimicrobiana de ciprofloxacino. Rev.Esp.Quimioterap. 3:229-234.

MOLIN Ö., NILSSON L., ANSEHN S. 1983. Rapid detection of bacterial growth in blood cultures by bioluminescent assay of bacterial ATP. J. Clin. Microbiol. 18: 521-525.

MONOD J. 1949. The growth of bacterial cultures. Annu. Rev. Microbiol. 3: 371-394.

MOORE R.D., SMITH C.R. and LIETMAN P.S. 1984. The association of aminoglycoside plasma levels with mortality in patients with gram-negative bacteremia. J. Infect. Dis. 149: 443-448.

MORDENTI J.J., QUINTILIANI R. and NIGHTINGALE C.H. 1985. Combination antibiotic therapy: comparison of constant infusion and intermittent bolus dosing in an experimental animal model. J. Antimicrob. Chemother. 15 (Suppl. A): 313-321.

MUIJSKEN M.A., VREEDE R.W., VAN DIJK W.C., HAVERKORN M.J., KAUFMAN L. and DERDE M.P. 1988. Estudio clínico aleatorio sobre la eficacia e inocuidad de la administración una vez al día de netilmicina y la administración según el protocolo convencional en pacientes con infecciones graves. J. Drug Dev. 1 (Suppl.3): 145-146.

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

NADLER H.L., CURBY W.A., FORGACS P. and ROSENBERG F. 1989. Comparison of electronic and viability counting methods for determination of postantibiotic effect of oxacillin on *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 33: 2155-2156.

NADLER H.L., PITKIN D.H. and SHEIKH W. 1989. The postantibiotic effect of meropenem and imipenem on selected bacteria. J. Antimicrob. Chemother. 24 (Suppl. A): 225-231.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. 1990. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically- second edition. Approved Standard. NCCLS Document M7-A2. Villanova, Pa.: NCCLS.

NEU H.C., NOVELLI A. and CHIN N.X. 1989. Comparative in vitro activity of a new quinolone, AM-1091. Antimicrob. Agents Chemother. 33: 1036-1041.

NEWTON D.W. and KLUZA R.B. 1978.  $pK_a$  values of medicinal compounds in pharmacy practice. Drug Intell. Clin. Pharm. 12: 546-554.

NICOLAU D.P., FREEMAN C.D., BELLIVEAU P.P., NIGHTINGALE C.H., ROSS J.W. and QUINTILIANI R. 1995. Experience with a once-daily aminoglycoside program administered to 2,184 adult patients. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 650-655.

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

NOVELLI A., MAZZEI T., FALLANI S., GIANASSI S. and PERITI P. 1992. Postantibiotic effect and postantibiotic leukocyte enhancement of fleroxacin and ciprofloxacin on *S.aureus* and *S.epidermidis* strains. En Program and Abstracts of the 32nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Abstract 535. American Society for Microbiology. California, p. 200.

ODENHOLT-TORNQVIST I. 1989. Pharmacodynamics of beta-lactam antibiotics. Studies on the paradoxical and postantibiotic effects in vitro and in an animal model. Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 58: 1-55.

ODENHOLT-TORNQVIST I. 1993. Studies on the postantibiotic effect and the postantibiotic sub-MIC effect of meropenem. J. Antimicrob. Chemother. 31: 881-892.

ODENHOLT I., HOLMS S.E. and CARS O. 1988. An in vivo model for evaluation of the postantibiotic effect. Scand. J. Infect. Dis. 20: 97-103.

ODENHOLT I., HOLM S.E. and CARS O. 1989. Effects of benzylpenicillin on *Streptococcus pyogenes* during the postantibiotic phase in vitro. J. Antimicrob. Chemother. 24: 147-156.

ODENHOLT I., HOLM S. E. and CARS O. 1990. Effects of supra and sub-MIC benzylpenicillin concentrations on group A  $\beta$ -haemolytic streptococci during the postantibiotic phase in vivo. J. Antimicrob. Chemother. 26: 193-201.

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

ODENHOLT-TORNQVIST I., LÖWDIN E. and CARS O. 1991. Pharmacodynamic effects of subinhibitory concentrations of  $\beta$ -lactam antibiotics in vitro. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 1834-1839.

ODENHOLT-TORNQVIST I., LÖWDIN E. and CARS O. 1992. Postantibiotic sub-MIC effects of vancomycin, roxithromycin, sparfloxacin, and amikacin. Antimicrob. Agents Chemother. 36: 1852-1858.

OSHIDA T., ONTA T., NAKANISHI N., MATSUSHITA T. and YAMAGUCHI T. 1990. Activity of sub-minimal inhibitory

concentrations of aspoxicillin in prolonging the postantibiotic effect against *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. 26: 29-38.

PAGLIA P., MOLINARI G., PESCE A. and DEBBIA E.A. 1989. Dactimicin, a new aminoglycoside: in vitro activity, post-antibiotic effect and interaction with other antibiotics. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 8: 639-643.

PARKER R. F. AND LUSE S. 1948. The action of penicillin on *Staphylococcus*: further observations on the effect of a short exposure. J. Bacteriol. 56: 75-84.

PARKER R.F. and MARSH H.C. 1946. The action of penicillin on *Staphylococcus*. J. Bacteriol. 51: 181-186.

PASTOR A., PEMAN J. and CANTON B. 1994. In-vitro postantibiotic effect of sparfloxacin and ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis*. J. Antimicrob. Chemother. 34: 679-685.

POWELL S.H., THOMPSON W.L., LUTHE M.A., STERN R.C., GROSSNIKLAUS D.A., BLOXHAM D.D., GRODEN D.L., JACOBS M.R., DISCENNA A.O., CASH H.A. and KLINGER J.D. 1983. Once-daily vs. continuous aminoglycoside dosing: efficacy and toxicity in animal and clinical studies of gentamicin, netilmicin, and tobramycin. J. Infect. Dis. 147: 918-932.

PRULL H., LEWIS G. and McDONALD P.J. 1988. Enhanced susceptibility of gram-negative bacteria to phagocytic killing by human polymorphonuclear leukocytes after brief exposure to aztreonam. J. Antimicrob. Chemother. 22 (Suppl. B): 675-686.

PRULL H. and McDONALD P. J. 1990. Lomefloxacin-induced modification of the kinetics of growth of Gram-negative bacteria

and susceptibility to phagocytic killing by human neutrophils. J. Antimicrob. Chemother. 25: 91-101.

PRUUL H., WETHERALL B.L. and McDONALD P.J. 1981. Enhanced susceptibility of *Escherichia coli* to intracellular killing by human polymorphonuclear leukocytes after in vitro incubation with chloramphenicol. Antimicrob. Agents Chemother. 19: 945-951.

PRUUL H., WETHERALL B.L. and McDONALD P.J. 1986. In vitro killing of erythromycin-exposed group A streptococci by polymorphonuclear leukocytes. Eur. J. Clin. Microbiol. 5: 405-410.

RAPONI G., HOEPELMAN I.M., ROZENBERG-ARSKA M., VREEDE R.W., BOX A. and VERHOEF J. 1988. Efecto de los antibióticos sobre las defensas del huésped. J. Drug Dev. 1 (Suppl.3): 55-56.

RAPONI G., KELLER N., OVERBEEK B.P., ROZENBERG-ARSKA M., VAN KESSEL K.P.M. and VERHOEF J. 1990. Enhanced phagocytosis of encapsulated *Escherichia coli* strains after exposure to sub-MICs of antibiotics is correlated to changes of the bacterial cell surface. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 332-336.

RAPONI G., VREEDE R.W., ROZENBERG-ARSKA M., HOEPELMAN I.M., KELLER N. and VERHOEF J. 1989. The influence of subminimal inhibitory concentration of netilmicin and ceftriaxone on the interaction of *Escherichia coli* with host defenses. J. Antimicrob. Chemother. 23: 565-576.

RAVIZZOLA G., CARUSO A., MANCA N., SAVOLDI B. and TURANO A. 1983. In-vitro activity of cefotetan and other cephalosporins on *Klebsiella* and resistance to inactivating bacterial enzymes. J. Antimicrob. Chemother. 11 (Suppl.A): 133-138.

RENNENBERG J. and WALDER M. 1988. A mouse model for simultaneous pharmacokinetic and efficacy studies of antibiotics at sites of infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 22: 51-60.

RENNENBERG J. and WALDER M. 1989. Postantibiotic effects of imipenem, norfloxacin, and amikacin in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23: 1714-1720.

RESCOTT D.L., NIX D.E., HOLDEN P. and SCHENTAG J. 1988. Comparison of two methods for determining in vitro postantibiotic effect of three antibiotics on *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 450-453.

REYMAN M.T. 1981. Treatment of serious gram-negative bacillary infections with sub-MICs of aminoglycoside antibiotics. Significance of low concentrations of antibiotics in infections. In Proceedings of the 12th International Congress of Chemotherapy, pp. 19-24. Florence, Italy.

RICHARDS J.C.S., JASON A.C., HOBB G., GIBSON D.M. and CHRISTIE R.H. 1978. Electronic measurement of bacterial growth. *J. Phys. E Sci. Instrum.* 11: 560-568.

RODMAN D.P., MAXWELL A.J. and MCKNIGHT J.T. 1994. Extended dosage intervals for aminoglycosides. *Am. J. Hosp. Pharm.* 51: 2016-2021.

ROLINSON G.N., MacDONALD A.C. and WILSON D.A. 1977. Bactericidal action of  $\beta$ -lactam antibiotics on *Escherichia coli* with particular reference to ampicillin and amoxycillin. *J. Antimicrob. Chemother.* 3: 541-553.

ROSENDAAL R., BAKKER-WOUDENBERG I.A.J.M., VAN DEN BERG J.C. and MICHEL M.F. 1985. Therapeutic efficacy of continuous versus intermittent administration of ceftazidime in an experimental

*Klebsiella pneumoniae* pneumonia in rats. J. Infect. Dis. 152: 373-378.

ROSENDAAL R., BAKKER-WOUDENBERG I.A.J.M., VAN DEN BERGHE-VAN RAFFE M. and MICHEL M.F. 1986. Continuous versus intermittent administration of ceftazidime in experimental *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in normal and leukopenic rats. Antimicrob. Agents Chemother. 30: 403-408.

SABATH L.D. 1982. Antagonism of antimicrobial agents by products of inflammation, p. 74-83. En: Sabath L.D. (ed.) Action of antibiotics in patients. Hans Huber Publishers, Bern, Switzerland.

SABATH L.D., GERSTEIN D.A., LEAF C.D. and FINLAND M. 1970. Increasing the usefulness of antibiotics: treatment of infections caused by gram-negative bacilli. Clin. Pharmacol. Ther. 11: 161-169.

SANDE M.A., KORZENIOWSKI O.M., ALLEGRO G.M., BRENNAN R.O., ZAK O. and SCHELD W.M. 1981. Intermittent or continuous therapy of experimental meningitis due to *Streptococcus pneumoniae* in rabbits: preliminary observations on the postantibiotic effect in vivo. Rev. Infect. Dis. 3: 98-109.

SAVERINO D., DEBBIA E.A., PESCE A., LEPORE A.M. and SCHITO G.C. 1992. Antibacterial profile of flurithromycin, a new macrolide. J. Antimicrob. Chemother. 30: 261-272.

SCHWARZ A. 1988. Revisión de la eficacia e inocuidad de la netilmicina administrada una sola vez al día, en comparación con los protocolos de varias administraciones. J. Drug Dev. 1 (Suppl.3): 147-154.

SELWYN S. 1982. The evolution of the broad-spectrum penicillins. *J. Antimicrob. Chemother.* 9 (suppl. B): 1-10.

SHAH P.M. 1981. Bactericidal activity of ampicillin and amoxicillin. *J. Antimicrob. Chemother.* 8, Suppl. C: 93-99.

SHAH P.M., GHahremani M., GORRES F.J. and STILLE W. 1988. Bactericidal activity of antimicrobials in the dynamic kill-curve model. *J. Drug Dev.* 1 (Suppl.3): 35-47.

SHAH P.M., HUBERNER K.G. and STILLE W. 1978. In-vitro-Untersuchungen zur intermittierenden Therapie mit Penicillin G und Ampicillin. *Med. Welt.* 29: 888-892.

SIVERHUS D.J., EDMISTON C.E. Jr, CLAUSZ J.C. and GOHEEN M.P. 1988. Post-antibiotic effect in *Bacteroides fragilis* group. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 18: 326-336.

SMITH J.T. and LEWIN C.S. 1988. Chemistry and mechanism of action of quinolone antibacterials, p. 23-82. En: Andriole V.T. (ed.) *The Quinolones*. Academic Press, London.

SOLBERG C.O., ALLRED C.D. and HILL H.R. 1978. Influence of phenylbutazone on leukocyte chemiluminescence and function. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* [C] 86: 165-171.

SÖREN L., NILSSON M. and NILSSON L.E. 1995. Quantitation of antibiotic effects on bacteria by bioluminescence, viable counting and quantal analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* 35: 669-674.

SPENCER R.C., WHEAT P.F., WINSTANLEY T.G., COX D.M. and PLESTED S.J. 1987. Novel  $\beta$ -lactamase in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* conferring unusual resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 20: 919-921.

SPRATT B.G. 1978. The mechanism of action of penicillin. Sci.Prog. 65: 101-128.

SPRATT B.G. and PARDEE A.B. 1975. Penicillin-binding proteins and cell shape in *Escherichia coli*. Nature 254: 516-517.

STEERS E., FOLTZ E.L. and GRAVES B.S. 1959. An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. Antibiot. Chemother. 9: 307-311.

STEVENSON M.I., SCOTT E.M. and COLLIER P.S. 1988. Effect of ciprofloxacin in an in vitro pharmacokinetic model against *Pseudomonas aeruginosa* isolated during cystic fibrosis lung infection. J. Antimicrob. Chemother. 22 (Suppl.B): 491-498.

STURM A. W. 1989. Netilmicin in the treatment of gram-negative bacteremia: single daily versus multiple daily dosage. J. Infect. Dis. 159: 931-937.

TAMURA T., IMAE Y. and STROMINGER J.L. 1976. Purification to homogeneity and properties of two D-alanine carboxypeptidases I from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 251: 414-423.

TÄUBER M.G., ZAK O., SCHELD W.M., HENGSTLER B. and SANDE M.A. 1984. The postantibiotic effect in the treatment of experimental meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* in rabbits. J. Infect. Dis. 149: 575-583.

THORNSBERRY C., GAVAN T.L. and GERLACH E.H. 1977. New developments in antimicrobial agent susceptibility testing. Cumitech 6: 1-13. American Society for Microbiology, Washington D.C.

THRUPP L.D. 1986. Susceptibility testing of antibiotics in liquid media, p. 93-150. En: Lorian V. (ed.) Antibiotics in laboratory medicine, 2nd ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

TOENNIES G. and GALLANT D. L. 1949. The relation between photometric turbidity and bacterial concentration. Growth 13: 7-20.

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

TOMASZ A. 1979. The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillin: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 33: 113-137.

TOOTHAKER R.D., WELLING P.G. and CRAIG W.A. 1982. An in vitro model for the study of antibacterial dosage regimen design. J. Pharm. Sci. 71: 861-864.

TSUI S.Y.T., YEW W.W., LI M.S.K., CHAN C.Y. and CHENG A.F.B. 1993. Postantibiotic effects of amikacin and ofloxacin on *Mycobacterium fortuitum*. Antimicrob. Agents Chemother. 37: 1001-1003.

TULKENS P.M., CLERCKX-BRAUN F., DONNEZ J., IBRAHIM S., KALLAY Z., DELMEE M., JACQMIN P., GERSDORFF M., LESNE M., KAUFMAN L. and DERDE M.P. 1988. Safety and efficacy of aminoglycosides once-a-day: experimental data and randomized, controlled evaluation in patients suffering from pelvic inflammatory disease. J. Drug Dev. 1 (Suppl. 3): 71-82.

TUOMANEN E. and SCHWARTZ J. 1987. Penicillin-binding protein 7 and its relationship to lysis of non-growing *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 169: 4912-4915.

TURNIDGE J.D., GUDMUNDSSON S., VOGELMAN B. and CRAIG W.A. 1994. The postantibiotic effect of antifungal agents against common pathogenic yeasts. J. Antimicrob. Chemother. 34: 83-92.

VAN DER AUWERA P. 1988. Actividad bactericida, tasa de destrucción bacteriana y efecto postantibiótico en el suero de enfermos con infecciones urinarias tratados con netilmicina 6 mg/kg diarios, en comparación con 2 mg/kg tres veces al diarias. J. Drug Dev. 1 (Suppl. 3): 25-33.

VAN DER AUWERA P. and KLASTERSKY J. 1987. Serum bactericidal activity and postantibiotic effect in serum of patients with urinary tract infection receiving high-dose amikacin. Antimicrob. Agents Chemother. 31: 1061-1068.

VAN DER AUWERA P., MEUNIER F., IBRAHIM S., KAUFMAN L., DERDE M. P. and TULKENS P. M. 1991. Pharmacodynamic parameters and toxicity of netilmicin (6 milligrams/kilogram/day) given once daily or in three divided doses to cancer patients with urinary tract infection. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 640-647.

VOGELMAN B.S. and CRAIG W.A. 1985. Postantibiotic effects. J. Antimicrob. Chemother. 13 ( Suppl. A): 37-46.

VOGELMAN B. and CRAIG W.A. 1986. Kinetics of antimicrobial activity. J. Pediatr.; 108: 835-840.

VOGELMAN B., GUDMUNDSSON S. and CRAIG W.A. 1983. Reduced susceptibility of bacteria during the postantibiotic effect (PAE) to cidal antimicrobials. En Program and Abstracts of the Twenty-third Interscience Conference on Antimicrobial Agents and

Chemotherapy. Abstract 895, American Society for Microbiology, Washington, D.C., p. 249.

VOGELMAN B., GUDMUNDSSON S., LEGGETT J., TURNIDGE J., EBERT S. and CRAIG W.A. 1988. Correlation of antimicrobial pharmacokinetic parameters with therapeutic efficacy in an animal model. *J. Infect. Dis.* 158: 831-847.

VOGELMAN B., GUDMUNDSSON S., TURNIDGE J., LEGGETT J. and CRAIG W. A. 1988. In vivo postantibiotic effect in a thigh infection in neutropenic mice. *J. Infect. Dis.* 157: 287-298.

WALSH A.L., SMITH M.D., WUTHIEKANUN V. and WHITE N.J. 1995. Postantibiotic effects and *Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei*: evaluation of current treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 2356-2358.

WATANABE T., TOTSUKA K., KATAHIRA J., FUKADA T., HASEGAWA H., SHIBATA Y., KIKUCHI K. and SHIMIZU K. 1989. Postantibiotic effect (PAE) of antimicrobial agents against *Mycoplasma pneumoniae*. In Programs and Abstracts of the Twenty-Ninth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Abstract 937. American Society for Microbiology. Washington D.C., p. 258.

WEBSTER C., GHAZANFAR K. and SLACK R. 1988. Sub-inhibitory and postantibiotic effect of spiramycin and erythromycin on *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 22 (Suppl B): 33-39.

WHEELER T.G. and GOLDSCHMIDT M.C. 1975. Determination of bacterial cell concentrations by electrical measurements. *J. Clin. Microbiol.* 1: 25-29.

WILSON D.A. and ROLLISON G.N. 1979. The recovery period following exposure of bacteria to penicillins. *Chemotherapy* 25: 14-22.

WINSTANLEY T. G. 1990. Penicillin-induced post antibiotic effects on streptococci in vitro and in vivo. *J. Antimicrob. Chemother.* 26:165-173.

WINSTANLEY T., EDWARDS C. and HASTINGS M. 1991. Post-antibiotic effect of teicoplanin. *J. Antimicrob. Chemother.* 27: 683-684.

WINSTANLEY T. G. and HASTINGS J. G. M. 1989. Penicillin-aminoglycoside synergy and post-antibiotic effect for enterococci. *J. Antimicrob. Chemother.* 23: 189-199.

WINSTANLEY T.G. and HASTINGS J.G.M. 1990. Sinergy between penicillin and gentamicin against enterococci. *J. Antimicrob. Chemother.* 25: 551-560.

ZAK O. and KRADOLFER F. 1979. Effects of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics in experimental infections. *Rev. Infect. Dis.* 1: 862-879.

ZAK O., TOSCH W. and SANDE M.A. 1985. Correlation of antibacterial activities of antibiotics in vitro and in animal models of infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 15 (Suppl.A): 273-282.

ZHANEL G.G., CRAMPTON J., KIM S., NICOLLE L.E., DAVIDSON R.J. and HOBAN D.J. 1992. Antimicrobial activity of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* as determined by the killing curve method and the postantibiotic effect. *Chemotherapy* 38: 388-394.

ZHANEL G.G. and CRAIG W.A. 1994. Pharmacokinetic contributions to postantibiotic effects. Clin. Pharmacokinet. 27: 377-392.

ZHANEL G.G., DAVIDSON R. J. and HOBAN D. J. 1990. Reproducibility of the in-vitro postantibiotic effect of fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. 26: 724-726.

ZHANEL G.G., KARLOWSKY J.A., DAVIDSON R.J. and HOBAN D.J. 1991. Influence of human urine on the in vitro activity and postantibiotic effect of ciprofloxacin against *Escherichia coli*. Chemotherapy 37: 218-223.

ZHANEL G.G., KARLOWSKY J.A., DAVIDSON R.J. and HOBAN D.J. 1992. Effect of pooled human cerebrospinal fluid on the postantibiotic effects of cefotaxime, ciprofloxacin, and gentamicin against *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 26: 1136-1139.

ZHANEL G.G., KARLOWSKY J.A., HOBAN D.J. and DAVIDSON R.J. 1991. Antimicrobial activity of subinhibitory concentrations of aminoglycosides against *Pseudomonas aeruginosa* as determined by the killing-curve method and the postantibiotic effect. Chemotherapy 37: 114-121.

ZIMMERMAN S.B. and STAPLEY O. 1976. Relative morphological effects induced by cefoxitin and other  $\beta$ -lactam antibiotics in vitro. Antimicrob. Agents Chemother. 9: 318-326.

ZINNER S.H., HUSSON M. and KLASTERSKY J. 1981. An artificial capillary in vitro kinetic model of antibiotic bactericidal activity. J. Infect. Dis. 144: 583-587.



Fdo: Dr. D. Manuel de la Riva Fraile  
DIRECTOR TESIS DOCTORAL



Fdo: Dra. Dña M. Victoria Borobio Imiso  
DIRECTORA TESIS DOCTORAL



Fdo: Dña M. Carmen Domínguez Jiménez  
DOCTORANDA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Examinado el presente trabajo por los señores firmantes  
el día de 18 de Octubre de 1996 en la Tesis Doctoral de  
MR CARTEN DOMINGUEZ JIMENEZ  
DESCRIPCION DE UN NUEVO METODO ESPECTROFOTOME-  
TRICO DE DETERMINACION DEL EFECTO POSTANTIBIO-  
TICO

APTO "CON LA VPE"

18 OCTUBRE 1996