

26

MONOGRAFÍAS DR. ANTONIO ESTEVE

MODELOS  
EXPERIMENTALES  
DE PATOLOGÍA  
INFECCIOSA

J.M. Miró • J.M. Gatell

© 2000, Fundación Dr. Antonio Esteve  
Llobet i Vall-Llosera, 2. E-08032 Barcelona.  
Teléfono: 93 436 84 05 Fax: 93 450 48 99.  
Correo electrónico: fundacion@esteve.org  
Internet: <http://www.esteve.org>

Depósito legal: B.- 20.237-2000  
Coordinación y producción:  
Ediciones Doyma, S.L.  
Travesera de Gracia, 17-21. E-08021 Barcelona  
*Impreso en España por Gráficas Almogávares*  
*Printed in Spain*

*La Fundación Dr. Antonio Esteve contempla como objetivo prioritario el estímulo del progreso de la terapéutica por medio de la comunicación y la discusión científica.*

*La Fundación quiere promover la cooperación internacional en la investigación farmacoterapéutica y, a tal fin, organiza reuniones internacionales multidisciplinares donde grupos reducidos de investigadores discuten los resultados de sus trabajos. Estas discusiones son recogidas en las publicaciones de los Esteve Foundation Symposia.*

*Otras actividades de la Fundación Dr. Antonio Esteve incluyen la organización de reuniones dedicadas a la discusión de problemas de alcance más local y publicadas en el formato de la presente monografía. La Fundación participa también en conferencias, seminarios, cursos y otras formas de apoyo a las ciencias médicas, farmacéuticas y biológicas y, con carácter bienal, concede un premio al mejor artículo publicado por un autor español dentro del área de la farmacoterapia.*

*Más recientemente, se ha iniciado la publicación de la serie Pharmacotherapy revisited: An Esteve Foundation Series, en la cual a través de diferentes volúmenes se recopilan, en edición facsímil, los principales artículos que sentaron las bases de una determinada disciplina.*

Los diferentes apartados de la presente monografía recogen la opinión de los correspondientes autores, por lo que la Fundación Dr. Antonio Esteve no se hace necesariamente partícipe de su contenido.

## **AGRADECIMIENTOS**

---

La Fundación Dr. Antonio Esteve desea expresar su agradecimiento a la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) y a la Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL) por aceptar el patrocinio científico de la reunión y de la actual monografía. También agradece a Marcel Brosa el diseño del programa *System Chair* y su adaptación técnica para la gestión informática de la moderación de las mesas redondas que dan lugar a la edición de estas monografías, así como a Pere Gavalrà y colaboradores por su contribución en las distintas fases de dicho proceso, a Anna Guerra por la transcripción de las discusiones y a Cristina García de la Maria y Francesc Marco por la revisión de los manuscritos.

# Modelos experimentales de patología infecciosa

J.M. MIRÓ Y J.M. GATELL		M.C. BALAGUÉ, E.M. TARGARONA Y M. CAINZOS	
Introducción	9	Modelo de infecciones intraabdominales	103
F. MARCO, J. LIÑARES Y J.M. MIRÓ		M. CUENCA-ESTRELLA, J.L. RODRÍGUEZ-TUDELA Y J. GAVALDÀ	
Utilidad de los estudios <i>in vitro</i> para seleccionar los estudios <i>in vivo</i>	11	Modelos animales de infecciones fúngicas	119
F. FUENTES, M.J. GIMÉNEZ Y J. PRIETO		P.J. CARDONA, V. AUSINA Y J. CAYLÀ	
Modelos experimentales en farmacodinamia	23	Modelos de tuberculosis experimental	135
J. GAVALDÀ Y A. PAHISSA		M. GOMIS, J. BARBERÁN Y J. ARIZA	
El modelo de farmacocinética humanizada en los modelos animales de infección	35	Modelos experimentales de osteomielitis	149
J. GAVALDÀ, J.M. MIRÓ Y M.L. FERNÁNDEZ		M. DOMINGO, J. CANTÓ Y J. PUJOLS	
Modelo de endocarditis	47	Cómo debe organizarse un estabulario con modelos de patología infecciosa	163
C. CABELLOS, J. PACHÓN Y B. ALMIRANTE		J.M. GATELL	
Modelo de meningitis	71	A modo de conclusión	177
J. PACHÓN, J. GAVALDÀ Y J.M. MIRÓ		CENTROS CON MODELOS EXPERIMENTALES DE PATOLOGÍA INFECCIOSA QUE HAN PARTICIPADO EN ESTA MONOGRAFÍA	179
Modelo de neumonía	81	ÍNDICE DE MATERIAS	181
J.A. CAPDEVILA, A. PASCUAL Y A. SITGES-SERRA			
Modelo de infecciones por cuerpo extraño	91		

# Relación de participantes\*

## BENITO ALMIRANTE

Servicio de Enfermedades Infecciosas  
Hospital Universitario Vall d'Hebron  
Pg. Vall d'Hebron, 119-129  
08035 Barcelona

## JAVIER ARIZA

Servicio de Enfermedades Infecciosas  
Ciudad Sanitaria de Bellvitge  
Feixa Llarga, s/n  
08907 L'Hospitalet de Llobregat

## VICENÇ AUSINA

Servicio de Microbiología  
Hospital Germans Trias i Pujol  
Carretera del Canyet, s/n  
08916 Badalona

## M. CARMEN BALAGUÉ

Servicio de Cirugía General y Digestiva  
IDIBAPS\*\*-Hospital Clínic Universitari  
de Barcelona  
Villarroel, 170  
08036 Barcelona

## JOSÉ BARBERÁN

Servicio de Enfermedades Infecciosas  
Hospital Gómez Ulla  
Glorieta del Ejército, s/n  
28047 Madrid

## FÈLIX BOSCH

Fundación Dr. Antonio Esteve  
Llobet i Vall-Llosera, 2  
08032 Barcelona

## CARMEN CABELLOS

Servicio de Enfermedades Infecciosas  
Ciudad Sanitaria de Bellvitge  
Feixa Llarga, s/n  
08907 L'Hospitalet de Llobregat

## JORDI CANTÓ

Servicio de Estabulario  
Universitat Autònoma de Barcelona  
08193 Bellaterra

---

\*Participantes de la mesa redonda organizada por la Fundación Dr. Antonio Esteve el 12 de mayo de 1999 en Barcelona.

\*\*IDIPAPS = Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer.

## JOSEP ANTON CAPDEVILA

Servicio de Enfermedades Infecciosas  
Hospital Universitario Vall d'Hebron  
Pg. Vall d'Hebron, 119-129  
08035 Barcelona

## PERE-JOAN CARDONA

Servicio de Microbiología  
Hospital Germans Trias i Pujol  
Carretera del Canyet, s/n  
08916 Badalona

## MANUEL CUENCA-ESTRELLA

Servicio de Micología  
Centro Nacional de Microbiología  
Instituto de Salud Carlos III  
Ctra. Majadahonda-Pozuelo, km 2  
28220 Majadahonda

## MARIANO DOMINGO

Unidad de Anatomía Patológica  
Facultad de Veterinaria  
Universitat Autònoma de Barcelona  
Campus de Bellaterra

## SERGIO ERILL

Fundación Dr. Antonio Esteve  
Llobet i Vall-Llosera, 2  
08032 Barcelona

## FERNANDO FUENTES MARTÍNEZ

Departamento de Microbiología  
Facultad de Medicina  
Universidad Complutense de Madrid  
Avda. Complutense, s/n  
28040 Madrid

## CRISTINA GARCÍA DE LA MÀRIA

Servicio de Microbiología  
IDIBAPS-Hospital Clínic Universitari  
de Barcelona  
Villarroel, 170  
08036 Barcelona

## JOSÉ M<sup>a</sup> GATELL

Servicio de Enfermedades Infecciosas  
IDIBAPS-Hospital Clínic Universitari  
de Barcelona  
Villarroel, 170  
08036 Barcelona

## JOAN GAVALDÀ

Servicio de Enfermedades Infecciosas  
Hospital Universitario Vall d'Hebron  
Pg. Vall d'Hebron, 119-129  
08035 Barcelona

## AMÉRICA GIMÉNEZ

Estabulario Facultad de Medicina  
Universitat de Barcelona  
Casanova, 143  
08036 Barcelona

## FRANCESC GUDIOL

Servicio de Enfermedades  
Infecciosas  
Ciudad Sanitaria de Bellvitge  
Feixa Llarga, s/n  
08907 L'Hospitalet de Llobregat

## JOSEFINA LIÑARES

Servicio de Microbiología  
Ciudad Sanitaria de Bellvitge  
Feixa Llarga, s/n  
08907 L'Hospitalet de Llobregat

## FRANCESC MARCO

Servicio de Microbiología  
IDIBAPS-Hospital Clínic Universitari  
de Barcelona  
Villarroel, 170  
08036 Barcelona

## JOSÉ MARÍA MIRÓ

Servicio de Enfermedades  
Infecciosas  
IDIBAPS-Hospital Clínic Universitari  
de Barcelona  
Villarroel, 170  
08036 Barcelona

## JERÓNIMO PACHÓN

Servicio de Enfermedades Infecciosas  
Hospitales Universitarios Virgen del  
Rocío  
Avda. Manuel Siurot, s/n  
41013 Sevilla

## ALBERT PAHISSA

Servicio de Enfermedades Infecciosas  
Hospital Universitario Vall d'Hebron  
Pg. Vall d'Hebron, 119-129  
08035 Barcelona

## ÁLVARO PASCUAL

Departamento de Microbiología  
Facultad de Medicina  
Apdo. 914  
41080 Sevilla

## JOAN PUJOLS

Unidad de Sanidad Animal  
IRTA  
Via Circulació Nord, tram 6h  
08040 Barcelona

## JUAN LUIS RODRÍGUEZ TUDELA

Servicio de Micología  
Centro Nacional de Microbiología  
Instituto de Salud Carlos III  
Ctra. Majadahonda-Pozuelo, km 2  
28220 Majadahonda

## EDUARDO M<sup>a</sup> TARGARONA

Servicio de Cirugía General y  
Digestiva  
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau  
Sant Antoni M<sup>a</sup> Claret, 167  
08025 Barcelona

## M<sup>a</sup> FE TUBAU

Servicio de Microbiología  
Ciudad Sanitaria de Bellvitge  
Feixa Llarga, s/n  
08907 L'Hospitalet de Llobregat

## Relación de colaboradores\*

### MIGUEL CAINZOS

Servicio de Cirugía General y Digestiva  
Hospital General de Galicia  
Galeras, s/n  
15705 Santiago de Compostela

### JOAN CAYLÀ

Servicio de Epidemiología  
Institut Municipal de la Salut  
Plaça Lesseps, 1  
08023 Barcelona

### MANUEL LUIS FERNÁNDEZ-GUERRERO

División de Enfermedades Infecciosas  
Fundación Jiménez Díaz  
Avda. de los Reyes Católicos, 2  
28040 Madrid

### MARÍA JOSÉ GIMÉNEZ MESTRE

Departamento Médico  
SmithKline Beecham S.A.  
Madrid

### MANUEL GOMIS

Servicio de Enfermedades Infecciosas  
Hospital del Aire  
Arturo Soria, 82  
28027 Madrid

### JOSÉ PRIETO

Departamento de Microbiología  
Facultad de Medicina  
Universidad Complutense de Madrid  
Avda. Complutense, s/n  
28040 Madrid

### ANTONIO SITGES-SERRA

Departamento de Cirugía  
Hospital Universitario del Mar. IMIM  
Pg. Marítim, 25-29  
08003 Barcelona

---

\*Coautores de las ponencias y los artículos generados por la mesa redonda organizada por la Fundación Dr. Antonio Esteve el 12 de mayo de 1999 en Barcelona.



---

# Introducción

---

Los modelos animales que reproducen una determinada enfermedad infecciosa constituyen, desde hace más de un siglo, uno de los pilares en los que se fundamenta el desarrollo de la medicina al mejorar nuestro conocimiento sobre su fisiopatología, y desde hace más de 50 años han servido para estudiar su prevención y su tratamiento con antimicrobianos, permitiendo, además, evaluar el desarrollo de nuevas moléculas antiinfecciosas o de nuevas estrategias terapéuticas frente a la aparición de microorganismos multiresistentes. La mayoría de modelos experimentales de enfermedades infecciosas que se están utilizando en la actualidad reúnen los criterios de los modelos discriminativos ideales al reproducir la infección de forma lo más similar posible a lo que ocurre en los seres humanos. Estos modelos intentan tener una técnica de infección simple; los microorganismos causantes, la puerta de entrada, la diseminación en el organismo y la afectación tisular deben ser lo más parecidos a lo que ocurre en el ser humano; la gravedad, el curso y la duración de la enfermedad deben ser predecibles, reproducibles y analizables, y deben ser capaces de medir y reproducir la eficacia del tratamiento antimicrobiano. Por tanto, los resultados que se obtengan con estos modelos deben permitir conocer mejor la fisiopatología de la enfermedad infecciosa que reproducen y los resultados preclínicos que se obtengan al evaluar los tratamientos antimicrobianos deben ser la base para poder diseñar ensayos clínicos en humanos.

A juzgar por los artículos publicados en las revistas médicas de mayor prestigio, el progreso experimentado en los últimos años con el uso de estos modelos es espectacular, y resulta relativamente frecuente observar que las contribuciones proceden de grupos españoles. Por dicha razón y gracias al apoyo institucional de la Fundación Dr. Antonio Esteve, el día 12 de mayo de 1999 se realizó una reunión a puerta cerrada con los principales grupos españoles que trabajan en este campo que ha permitido ponerlos en contacto, conocer sus opiniones sobre este tema y escribir

esta monografía que analiza varios modelos experimentales de patología infecciosa bacteriana y fúngica y que evalúa su utilidad en los avances en la fisiopatología, profilaxis y tratamiento de las enfermedades infecciosas. En esta monografía se describen los modelos de endocarditis, meningitis, osteomielitis, infecciones por cuerpo extraño, infecciones intraabdominales, infecciones fúngicas y de la tuberculosis. En todos los casos se realiza una descripción detallada del modelo(s) *in vivo* de referencia, se comentan las ventajas y limitaciones del modelo experimental y de forma sistemática se revisan los avances que ha supuesto el modelo en el conocimiento de la fisiopatología de ese proceso infeccioso y en la profilaxis y el tratamiento del mismo. Además, se han añadido tres capítulos adicionales que complementan este tema. El primero describe qué estudios deben realizarse *in vitro* para seleccionar los antimicrobianos que se utilizarán en el modelo animal. El segundo analiza los modelos de farmacodinamia y farmacocinética humanizada con el fin de corregir una de las principales limitaciones de la administración de antimicrobianos en los animales, la diferente farmacocinética que tienen con respecto al ser humano. El último capítulo describe cómo debe organizarse un estabulario con modelos animales de enfermedades infecciosas, haciendo hincapié en el diseño del estabulario según el tipo de animales y agentes infecciosos utilizados, las rutinas de trabajo (planificación, *stocks*, recepción de animales, alojamiento, cuarentena, limpieza o control sanitario), las precauciones a tomar en el manejo de los animales y la formación que debe tener el personal del estabulario.

Somos conscientes de que esta monografía presenta sus limitaciones, ya que no se revisan todos los modelos de enfermedades infecciosas ni se analizan todos los temas relacionados con la experimentación animal. Sin embargo, creemos que éste puede ser el punto de partida para que en el futuro puedan realizarse iniciativas similares que la complementen y la mejoren. En este sentido, queremos agradecer el patrocinio

científico de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) y de la Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL). La distribución de esta monografía entre los socios interesados de ambas entidades puede mejorar su difusión. El listado preliminar de los grupos españoles que disponen de modelos de enfermedades infecciosas y que se describe en el anexo final de la monografía puede facilitar los contactos y la formación de profesionales en nuestro

país, así como la creación de un núcleo de grupos de trabajo que a la larga mejore la investigación de la enfermedad infecciosa preclínica en nuestro país.

**José M.<sup>a</sup> Miró\* y José M.<sup>a</sup> Gatell\*\***

\* *Especialista Senior. Profesor Asociado de Medicina.*

Correo electrónico: miro@medicina.ub.es

\*\* *Consultor. Profesor Asociado de Medicina.*

*Servicio de Enfermedades Infecciosas.*

*IDIBAPS\*-Hospital Clínic Universitari de Barcelona.*

---

<sup>\*</sup> IDIPAPS = Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer.





---

# Utilidad de los estudios *in vitro* para seleccionar los estudios *in vivo*

---

Francesc Marco<sup>a,\*</sup>, Josefina Liñares<sup>b</sup> y José María Miró<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Serveis de Microbiologia y <sup>c</sup>Malalties Infeccioses.

IDIBAPS (Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer)-Hospital Clínic Universitari de Barcelona.

<sup>b</sup>Servei de Microbiologia. Hospital de Bellvitge. L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona.

---

## RESUMEN

El conocimiento de los métodos utilizados para valorar la actividad *in vitro* de los antibióticos es fundamental para el desarrollo de muchos modelos experimentales en enfermedades infecciosas. La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por agar dilución, macro o microdilución o por E-test, o la determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) informa acerca de la actividad *in vitro* de un antibiótico en particular. Para analizar la actividad de dos antibióticos en combinación deben realizarse pruebas más complejas como curvas de letalidad o el método del tablero de ajedrez. La actividad bactericida del suero (ABCS) aporta información sobre la actividad del suero más el antibiótico administrado frente al microorganismo responsable de la infección. Otras técnicas de utilidad en los modelos experimentales en animales son la determinación de las concentraciones de los antibióticos en el suero por bioensayo y el cultivo cuantitativo de los tejidos.

### Palabras clave:

Curva de letalidad. Sinergia. Actividad *in vitro*.

---

## UTILITY OF *IN VITRO* STUDIES TO CHOOSE *IN VIVO* STUDIES

To develop an experimental animal model in infectious diseases requires to know the methodology used to determine the *in vitro* activity of antibiotics. Information about the *in vitro* activity of an antibiotic alone is obtained with the determination of agar dilution, macro or microdilution or E-test minimal inhibitory concentrations (MIC) and the minimal bactericidal concentrations (MBC). Time-Killing curves or checkerboard method studies the *in vitro* activity of antibiotic combinations. Serum bactericidal titers inform us about serum and antibiotic activity against the infectious etiological agent. Antibiotic serum levels determination by bioassay and quantitative bacteriological culture of tissue are useful procedures in experimental model animals.

### Key words:

Time-Killing curve. Synergy. *In vitro* activity.

---

---

## Introducción

Disponer de un modelo experimental animal que simule una determinada enfermedad ha sido y sigue siendo uno de los pilares en los que se fundamenta el desarrollo de la medicina. A juzgar por los artículos publicados en las revistas médicas de mayor prestigio, el progreso experimentado en los últimos años con el uso de estos modelos es espectacular. En teoría, la información

obtenida con los modelos experimentales puede ser de gran utilidad para comprender mejor la fisiopatogenia de la enfermedad objeto de estudio, para intentar mejorar su tratamiento, ya sea con la utilización de fármacos conocidos o de nueva síntesis o bien, para valorar las posibles opciones disponibles destinadas a prevenir su aparición.

Para el desarrollo de un modelo experimental en el que se va a estudiar una determinada enfermedad infecciosa será necesario conocer determinadas metodologías básicas que serán utilizadas, en primer lugar, como paso previo al desarrollo del modelo y que después se irán em-

---

\*Correo electrónico: marco@medicina.ub.es.

pleando a lo largo de su realización. En la rutina diaria de un laboratorio de microbiología no es infrecuente que se realicen algunas de las mismas, sobre todo la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). La información que se obtiene resulta fundamental, ya que, aparte de conocer la etiología de la enfermedad infecciosa que quiere estudiarse (microorganismos responsables o frecuencia de aislamiento), se conocerá su sensibilidad a los antibióticos (CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub>) o la existencia de posibles problemas particulares de resistencia y permitirá plantear la posibilidad de estudiar nuevas combinaciones de antibióticos o de nuevas moléculas de futura comercialización.

## Definiciones

Todo investigador en modelos experimentales de enfermedades infecciosas debe estar familiarizado con determinados términos utilizados frecuentemente en el laboratorio y asociados con el estudio de la actividad *in vitro* de los antibióticos. Se comentarán a continuación algunos de los más frecuentes. El término *concentración mínima inhibitoria (CMI)* hace referencia a la concentración más pequeña de antibiótico que inhibe el crecimiento macroscópico de un microorganismo después de un período de incubación estándar, generalmente de 18 a 24 h. La *concentración bactericida mínima (CBM)* es la concentración más pequeña de un antibiótico que produce una reducción igual o superior al 99,9 % en el número de células viables al compararlo con el inóculo inicial. Podemos utilizar el término *concentración mínima letal (CML)* para referirnos a cualquier microorganismo, incluyendo bacterias, hongos o virus.

La *actividad bacteriostática del suero (ABTS)* es la mayor dilución (o título) de una muestra de suero tomada de un paciente que está recibiendo un tratamiento antimicrobiano que inhibe el crecimiento macroscópico después de la incubación, por lo general de 18 a 24 h. El estudio se realiza con el microorganismo responsable de la infección del paciente. En la *actividad bactericida del suero (ABCS)* se valora la mayor dilución (o título) de una muestra de suero que produce una reducción igual o superior al 99,9 % en el número de células viables comparado con el inóculo inicial después de la incubación. En el *efecto paradójico o fenómeno "Eagle"* se produce un inexplicable aumento en el número de células viables (que indica un descenso de la actividad bactericida) a medida que la concentración del antibiótico se incrementa por encima de la CMI. La *tolerancia* es un fenómeno en el que antibióticos

bactericidas parecen carecer o tener reducida esta actividad frente a determinadas cepas. A menudo se cree que se debe a una alteración en la actividad enzimática autolítica de la propia bacteria, aunque podrían estar implicados otros mecanismos. Como parte de la definición de tolerancia se acepta que cuando detectamos este fenómeno la relación entre la CMB y la CMI es igual o superior a 32 (CMB/CMI  $\geq$  32). En las *curvas de letalidad (Time-Killing curves)* se valora la actividad bactericida de un antibiótico o de una combinación de antibióticos a una concentración determinada efectuando subcultivos a diferentes horas durante las 24 h de incubación. Esto permite conocer la disminución del número de bacterias viables en relación con el inóculo inicial según el tiempo de incubación y saber el grado de actividad bactericida del antibiótico. El método del tablero de ajedrez (*checkerboard test*) valora la actividad *in vitro* de dos (a veces tres) antibióticos para determinar si la combinación es más activa que cualquiera de los dos antibióticos administrados de forma individual.

## Métodos para estudiar la actividad *in vitro* de los antibióticos

Los métodos comentados en esta revisión son los siguientes:

### *Estudios con un solo antibiótico.*

Determinación de la CMI.

Agar dilución.

Macrodilución.

Microdilución.

E-test.

Determinación de la CMB

*Combinaciones de dos antibióticos.*

Curvas de letalidad (*Time-Killing curves*).

Método del tablero de ajedrez (*checkerboard*).

*Actividad in vivo de los antibióticos.*

Actividad bactericida del suero.

*Otras técnicas útiles.*

Determinación de las concentraciones de antibióticos en el suero.

Cultivo de tejidos.

## Estudios con un solo antibiótico. Determinación de la CMI

En la actualidad se dispone de diversos métodos que permiten conocer la actividad *in vitro* que manifiestan algunos fármacos frente a los microorganismos, ya sean bacterias, hongos o virus. Sólo se comentarán los de mayor utilidad práctica. La determinación de la CMI puede rea-

lizarse por agar dilución, macrodilución, microdilución o por el método E-test. La metodología recomendada para la realización de los tres primeros está perfectamente estandarizada en los documentos publicados por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)<sup>1</sup>, y las normas que proporciona el fabricante del método E-test (AB-Biodisk, Suecia) son fundamentales para su realización. Además, es altamente recomendable la lectura de las metodologías publicadas en manuales de laboratorio como el de la Sociedad Americana de Microbiología (ASM)<sup>2,3</sup> y libros de texto especializados<sup>4</sup>.

### Agar dilución

En este método se prepara una batería de placas de agar con el antibiótico a estudiar a diversas concentraciones, generalmente dobles, y se inoculan diversas cepas bacterianas con un replicador de Steers que permite depositar encima del medio alrededor de  $10^4$  unidades formadoras de colonias (UFC/spot). No nos extenderemos en su explicación porque se trata de un método laborioso que no suele emplearse de forma rutinaria y su uso queda restringido a estudios o valoraciones, generalmente de carácter multicéntrico, de nuevos antibióticos.

### Macrodilución y microdilución

La determinación de la CMI por macrodilución o microdilución se realiza en ambos casos con un medio líquido, y la diferencia fundamental entre los dos métodos es el volumen utilizado. En el método de macrodilución se suele trabajar con volúmenes de 1 o 2 ml y en el de microdilución

con 100  $\mu$ l, raras veces con 200  $\mu$ l (CMI para hongos) o con 50  $\mu$ l (métodos comercializados). En líneas generales, la sistemática de trabajo suele ser la siguiente.

**Medio de cultivo.** Por la buena reproducibilidad lote a lote, baja presencia de inhibidores y crecimiento satisfactorio para una gran mayoría de microorganismos patógenos, se suele emplear caldo de Mueller-Hinton suplementado con cationes ( $\text{Ca}^{++}$ , 20 a 25 mg/l y  $\text{Mg}^{++}$ , 10 a 12,5 mg/l). Algunos microorganismos necesitan la adición de suplementos, como ocurre con los estreptococos que requieren añadir al medio sangre de caballo lisada (proporción final: 2-5%). En la tabla I se indican los medios utilizados según los microorganismos más habituales.

**Preparación de los antibióticos a estudiar.** Una vez disuelto el antibiótico a partir de sustancia pura valorada (generalmente suministrada por el laboratorio fabricante del antibiótico) se realizan las diluciones apropiadas para conseguir las concentraciones deseadas en los tubos (macrodilución) o placas de microtítulo (microdilución). El volumen que se dispensará en los tubos será de 1 ml (aunque también puede trabajarse con 0,5 ml) y en los pocillos de microtítulo 50  $\mu$ l.

**Inóculo.** Se prepara un suspensión bacteriana con una turbidez equivalente a una escala de McFarland 0.5 (aproximadamente  $10^8$  UFC/ml) a partir de un cultivo puro de 24 h o inoculando varias colonias en un medio de cultivo líquido que se incubará hasta conseguir la densidad óptica deseada. Una vez ajustado el inóculo, se di-

TABLA I  
MEDIOS DE CULTIVO RECOMENDADOS PARA DETERMINAR LA CMI SEGÚN  
EL TIPO DE MICROORGANISMO

<i>Microorganismo</i>	<i>Medio de cultivo</i>	<i>Comentarios</i>
Enterobacterias	Mueller-Hinton más cationes	
<i>P. aeruginosa</i>	" /idem	Incubar 24 h completas para detectar resistencia a la vancomicina Añadir 2 % de NaCl para la oxacilina Incubar 24 h completas
<i>Enterococcus</i> spp.	" /idem	
<i>Staphylococcus</i> spp.	" /idem	
<i>Streptococcus</i> spp. (incluye <i>S. pneumoniae</i> )	Mueller-Hinton más cationes con 2-5 % de sangre lisada de caballo	
<i>L. monocytogenes</i>		
<i>Haemophilus</i> spp.	<i>Haemophilus</i> Test Medium (HTM)	

luirá de forma apropiada según cada método con la finalidad de conseguir que en cada tubo o pocillo de la placa tengamos alrededor de  $5 \times 10^5$  UFC/ml (margen de  $3-7 \times 10^5$  UFC/ml). Es aconsejable efectuar un recuento de colonias a partir del inóculo inicial para asegurar que el inóculo final sea lo más cercano posible al recomendado.

*Inoculación de los tubos o las placas de microtítulo.* En ambos métodos, la inoculación se efectuará preferentemente dentro de los primeros 15 min después de ajustar el inóculo. En el método de macrodilución se inoculan los tubos que contienen 1 ml con las concentraciones de antibióticos preparadas (a excepción del tubo control) con 1 ml del medio de cultivo (inóculo). El volumen final será de 2 ml. Si se ha optado por trabajar con 0,5 ml el volumen final será 1 ml. En el método de microdilución el volumen que contienen los pocillos con el antibiótico es de 50  $\mu$ l y se añaden otros 50  $\mu$ l con el inóculo. Otra opción, válida en los dos métodos, es añadir un volumen que no exceda el 10 % del volumen final (p. ej., 5-10  $\mu$ l de inóculo si el volumen final es de 100  $\mu$ l). Debe tenerse presente que cuando se añade el inóculo (1 ml o 50  $\mu$ l) se efectúa una dilución 1:2 que disminuye a la mitad la concentración del antibiótico. Es aconsejable realizar controles de la pureza del inóculo efectuando un subcultivo en un medio no selectivo.

*Incubación.* Para los dos métodos, el período de incubación es de 18-20 h a 35 °C en atmósfera aerobia. Para determinados microorganismos la incubación puede ampliarse a 20-24 h (*Streptococcus* spp. o *Haemophilus* spp.) o a 24 h completas (*S. aureus* oxacilina resistente o *Enterococcus* spp. resistente a vancomicina).

*Lectura de la CMI.* Una vez comprobada la presencia de crecimiento en el tubo o pocillo control se determinará la CMI, que corresponderá al primer tubo o pocillo en el que se produce una inhibición del crecimiento macroscópico del microorganismo estudiado.

*Control de calidad.* Las cepas recomendadas por el NCCLS son las más adecuadas para esta finalidad. *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 son las cepas más útiles, ya que la mayoría de antibióticos tienen unos intervalos de diluciones perfectamente definidos. El empleo de otras cepas ATCC dependerá de los microorganismos estudiados.

## E-test

La determinación de la CMI por el método E-test es relativamente reciente, pero poco a poco se va introduciendo en la rutina diaria de un laboratorio de microbiología. Los resultados obtenidos presentan una buena correlación con los métodos tradicionales (agar dilución, macrodilución o microdilución)<sup>5</sup> y tiene la enorme ventaja respecto a estos métodos de que su realización es mucho más sencilla. Por otra parte, es un método que podríamos considerar caro y su aplicación en el campo de los estudios *in vitro* en modelos experimentales quedaría limitado a aspectos muy concretos. En esencia, el método consiste en aplicar unas tiras de plástico que contienen el antibiótico que ensayamos en la superficie de una placa de agar que previamente ha sido inoculada con el microorganismo a estudiar. Tras la incubación y si el microorganismo es sensible se produce una elipse de inhibición alrededor de la tira con el antibiótico. La lectura de la CMI se realiza en el punto de intersección entre el borde de inhibición de la elipse y la tira con el antibiótico.

Para su realización es aconsejable seguir las instrucciones del fabricante, pero los aspectos más importantes son los siguientes: se utilizan los medios de cultivo (Mueller-Hinton, otros según el microorganismo) y la misma forma de preparación del inóculo (McFarland 0.5) que recomienda el NCCLS. Para la inoculación de las placas se introduce un escobillón estéril en la suspensión bacteriana y al retirarlo, se presiona contra la pared interna del tubo para eliminar el exceso de líquido. A continuación se siembra la superficie del agar tres veces, rotando la placa, con la finalidad de conseguir una distribución homogénea del inóculo. Se deja absorber este inóculo un mínimo de 10-15 min hasta que la superficie esté completamente seca y se deposita la tira o tiras de antibióticos (el número dependerá del diámetro de la placa de Petri utilizada) en la superficie del agar. Como las tiras deben guardarse a -20 °C debemos tener la precaución de retirarlas previamente y dejarlas a temperatura ambiente unos 30 min. La incubación de las placas no difiere de las indicaciones habituales del NCCLS, tras la cual se efectuará la lectura de la CMI como se ha comentado anteriormente.

## Determinación de la CMB

Una vez determinada la CMI y para conocer en qué dilución se produce una reducción del inóculo inicial igual o superior al 99,9 % (CMB),



deben efectuarse subcultivos en medio sólido de todos aquellos tubos o pocillos en los que no exista crecimiento macroscópico. Independientemente del método utilizado para determinar la CMI (macro o microdilución) es recomendable que el volumen a subcultivar sea de 100  $\mu$ l, aunque algunos laboratorios utilizan un volumen inferior (10  $\mu$ l). Con la ayuda de una pipeta se mezcla bien el contenido de cada tubo o pocillo sin crecimiento macroscópico aspirando de 6 a 10 veces. A continuación se aspira 100  $\mu$ l (por duplicado en el método por microdilución) y se dispensan en una placa de agar sangre (otro medio si no crece el microorganismo). Se deja secar 15-20 min y se extiende por la superficie del agar. La incubación se realiza a 35 °C durante 24-72 h según el microorganismo. Tras esta incubación se determina el número de colonias que crecen en las placas y se calcula el número máximo permitido según el inóculo inicial. Por ejemplo:  $5 \times 10^5$  UFC/ml (inóculo)  $\times$  0,1 ml (volumen sembrado en las placas)  $\times$  0,001 (porcentaje de células permitidas) = 50 UFC. En este caso, cuando la suma del número de colonias en las dos placas es igual o inferior a 50, la dilución es bactericida. Si se subcultiva un inóculo inferior (10  $\mu$ l) el cálculo del número de bacterias se realiza según el método de Pearson et al<sup>6</sup>.

### Lectura de la CMB

La CMB corresponderá a aquella dilución en la que tras los subcultivos en placas no existe crecimiento bacteriano o el número de colonias es inferior al número máximo permitido. Para profundizar en la metodología utilizada en la determinación de la CMB remitimos al lector a la lectura de bibliografía especializada<sup>4,7,8</sup>.

## Estudios con dos antibióticos

### Curvas de letalidad (Time-Killing curves)

La actividad bactericida de los antibióticos también puede estudiarse mediante la realización de curvas de letalidad. En este método se valora la dinámica de la actividad de los antibióticos, solos o en combinación, a lo largo de un período de tiempo de 24 h (hay excepciones según el microorganismo) mediante el recuento del número de bacterias viables a unas horas determinadas. No existe una metodología completamente estandarizada para su realización y hay ciertas diferencias según la bibliografía, por lo que la consulta de textos de referencia es im-

prescindible<sup>7,9</sup>. El estudio se realiza generalmente con un volumen total de 10 ml y se utilizan un tubo control de crecimiento, un tubo control de esterilidad, un tubo para cada antibiótico sólo a la concentración escogida y un tubo para cada combinación de antibióticos. Antes de realizar una curva de letalidad deben conocerse la CMI y la CMB de los antibióticos que quieren valorarse para decidir las concentraciones de los mismos (p. ej., CMI,  $1/2 \times$  CMI,  $1/4 \times$  CMI o  $2 \times$  CMI). Los aspectos más importantes del procedimiento que comentaremos son los siguientes:

*Medio de cultivo.* Se emplea medio de Mueller-Hinton suplementado con cationes. Para conocer el medio de cultivo más adecuado según el microorganismo véase la tabla I.

*Preparación del antibiótico.* Una vez disuelto el antibiótico se diluirá hasta conseguir una concentración 100 veces superior a la concentración final que vayamos a estudiar. En el caso de valorar la actividad de un solo antibiótico se añaden 100  $\mu$ l de la solución 100 veces concentrada a un tubo con 9,9 ml de medio de cultivo. Si se trata de estudiar la combinación de dos antibióticos se dispensan 100  $\mu$ l de la solución 100 veces concentrada del antibiótico A y 100  $\mu$ l de la solución 100 veces concentrada del antibiótico B a un tubo con 9,8 ml de medio de cultivo.

*Inóculo.* Debe prepararse de tal forma que permita conseguir, una vez diluido, un inóculo final entre  $5 \times 10^5$  y  $10^6$  UFC/ml. Una forma de conseguirlo sería preparar una suspensión bacteriana con una turbidez equivalente a una escala de McFarland 1 (aproximadamente  $3 \times 10^8$  UFC/ml) que se diluirá 1:5 mediante la adición de 1 ml de la suspensión a 4 ml de medio de cultivo (aproximadamente  $6 \times 10^7$  UFC/ml).

*Inoculación e incubación.* Añadiremos 100  $\mu$ l del inóculo que contiene  $6 \times 10^7$  UFC/ml a cada tubo (excepto tubo control de esterilidad) con 10 ml de medio más antibiótico(s). La concentración final será de  $6 \times 10^5$  UFC/ml. Se mezcla bien con la ayuda de un vórtex y antes de incubar a 35 °C se retiran 100  $\mu$ l del tubo control para efectuar diluciones seriadas y sembrar placas de cultivo que permitirán conocer el inóculo real inicial. Es aconsejable efectuar una siembra con un asa calibrada del tubo con el McFarland 1 para asegurar la pureza del inóculo. Algunos autores han intentado utilizar inóculos mayores ( $10^7$  o  $10^8$  UFC/ml) para intentar simular al máximo la situación real de la infección *in vivo*. En

estos casos se debe ser cauteloso en la interpretación de los resultados ya que cuando la concentración llega a  $10^9$ - $10^{10}$  UFC/ml se agotan los nutrientes del medio de cultivo.

A las horas determinadas previamente (p. ej., 4, 8 y 24 h) desde el inicio de la incubación, se retiran los tubos de la estufa, se agitan (vórtex) y se aspira una alícuota de 100  $\mu$ l de cada tubo para efectuar diluciones seriadas y siembra en placa de cultivo. Es importante que este proceso no se demore más allá de los 10 min para evitar interrumpir el ciclo de crecimiento.

*Lectura de resultados.* En primer lugar, se determina el inóculo real mediante el recuento de las colonias que han crecido en las placas de cultivo (aproximadamente  $6 \times 10^5$  UFC/ml). Posteriormente se cuentan las colonias que han crecido en las placas correspondientes a las diferentes diluciones realizadas según el tubo y las horas de siembra. Para calcular el número de UFC/ml es aconsejable utilizar las placas cuyo número de colonias sea entre 30 y 300. Placas con recuentos inferiores o superiores no son aconsejables, aunque pueden utilizarse si no hay otra opción. Una vez conocido el número de UFC/ml se convierten a valores en  $\log_{10}$  y se representan en una gráfica como las de la figura 1.

*Interpretación de los resultados.* Determinar si las combinaciones de antibióticos estudiadas son sinérgicas (reducción del crecimiento de al menos  $2 \log_{10}$  con la combinación de antibióticos comparado con el antibiótico solo más activo), antagónicas (incremento del crecimiento de al menos  $2 \log_{10}$  con la combinación de antibióticos comparado con el antibiótico solo más activo) o indiferentes (cuando existe una variación menor de  $1 \log_{10}$ , ya sea un incremento o un descenso en el crecimiento con la combinación de antibióticos comparado con el antibiótico solo más activo). Se considera que un antibiótico o combinación de antibióticos es bactericida cuando se produce un descenso de, al menos,  $3 \log_{10}$  en el número de bacterias a las 24 h de incubación en comparación con el inóculo inicial (fig. 1).

#### *Método del tablero de ajedrez (Checkerboard)*

El método del tablero de ajedrez es ampliamente utilizado en los laboratorios de microbiología para valorar combinaciones de antibióticos. Con este método se evalúa la actividad inhibitoria (a veces bactericida) de una combinación de antibióticos utilizando las recomendaciones del

NCCLS para determinar la CMI y la CMB. Puede realizarse en tubos (macrodilución) o en placas de microtítulo (microdilución)<sup>9,10</sup>.

El intervalo de concentraciones estudiadas para cada antibiótico suele ser de al menos cuatro o cinco diluciones por debajo de la CMI y dos diluciones por encima. Una vez diseñado, el método consiste en una serie de columnas en las que cada tubo o pocillo contiene la misma cantidad de un antibiótico A que está diluido a lo largo del eje  $\times$  (abscisas) y filas en las que cada tubo o pocillo contiene la misma cantidad de un antibiótico B que está diluido a lo largo del eje  $y$  (ordenadas) (fig. 2). El resultado es que en cada tubo o pocillo hay dos antibióticos con dos concentraciones (excepto en la columna o fila con un solo antibiótico o los controles).

En su realización se seguirán las recomendaciones comentadas en el apartado de determinación de la CMI en cuanto a la preparación de antibióticos, diluciones, medio de cultivo, inóculo, incubación y lectura de la CMI. Debe tenerse presente el factor de dilución a la hora de añadir los antibióticos para calcular su concentración final.

Para la interpretación de los resultados se determina la CMI de los antibióticos solos y en combinación, y se calcula el índice FIC (concentración inhibitoria fraccionada) para cada antibiótico según la fórmula siguiente:

$$FIC = FIC A + FIC B = A/CMIA + B/CMIB.$$

En la fórmula, A o B son la CMI del antibiótico en combinación y CMIA o CMIB son la CMI del antibiótico solo. Si el índice FIC es  $\leq 0,5$  se considera que la combinación de antibióticos es sinérgica, si es  $> 4$ , antagónica, y entre  $> 0,5$  y  $\leq 4$ , indiferente. Dentro de este último concepto podría añadirse una nueva definición que considerara una combinación como aditiva cuando el índice FIC es igual a 1. El método puede completarse, a la vez que se convierte en más complejo, si se llevan a cabo subcultivos para conocer la actividad bactericida (CMB) y calcular el índice FBC. En la figura 2 se representan gráficamente estos resultados.

#### **¿Qué método escoger para nuestros estudios?**

La primera opción probablemente sería determinar por microdilución la CMI y la CMB del antibiótico(s) a estudiar frente al microorganismo escogido. Una vez conocida esta información se planteará efectuar más estudios según el mode-

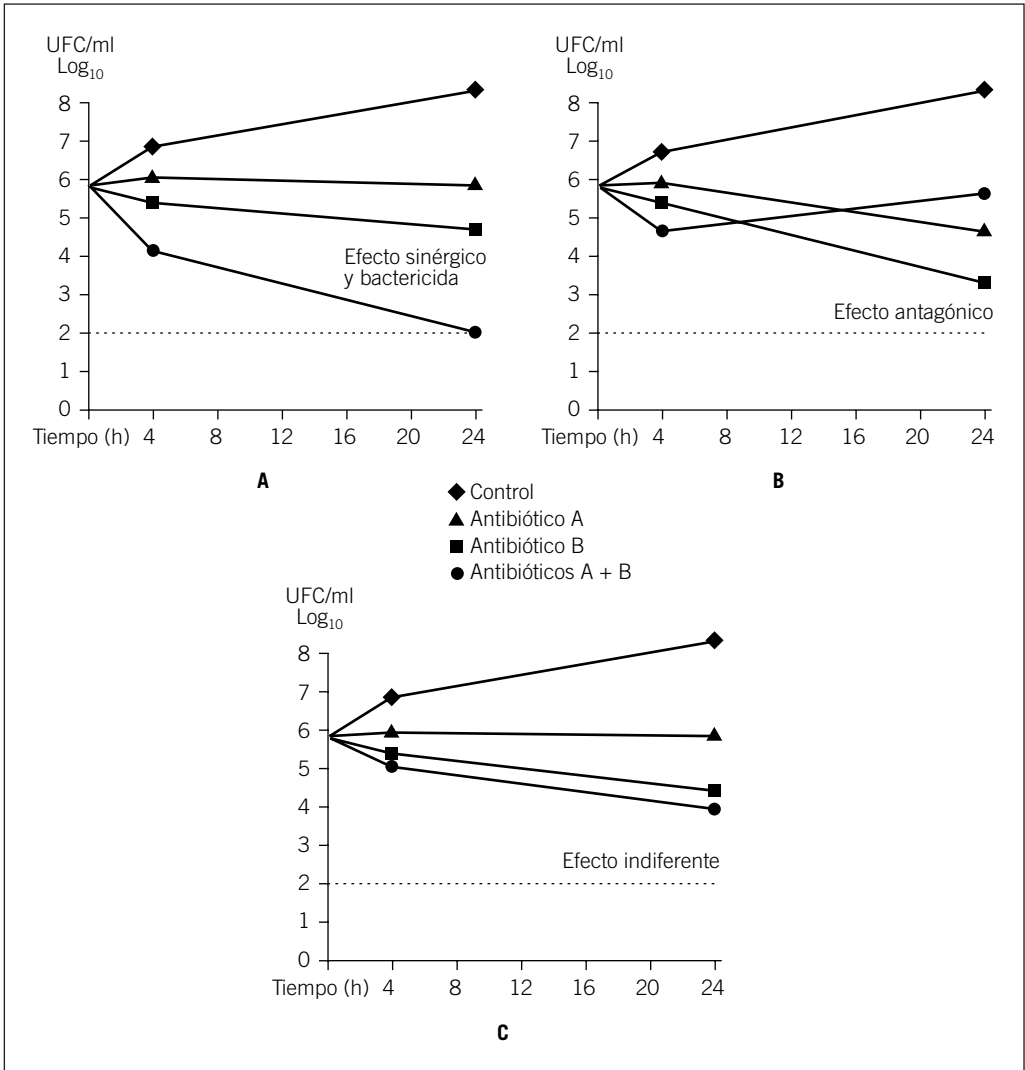


Fig. 1. Curvas de letalidad. Ejemplos de efectos sinérgico (A), antagónico (B) e indiferente (C) obtenidos al combinar dos antibióticos (A + B).

lo que se desee estudiar. Por ejemplo, si nuestra intención es valorar la eficacia de un nuevo antibiótico comparándolo con las pautas de tratamiento recomendadas, la información que nos proporciona la CMI y la CMB es, en principio, suficiente. Si lo que pretendemos es estudiar nuevas combinaciones de antibióticos, deberemos optar por la realización de curvas de letalidad, ya que proporcionan información sobre la dinámica de la actividad de los antibióticos.

### Actividad *in vivo* de los antibióticos

La actividad bactericida del suero es una prueba que, aunque realizada *in vitro*, informa acerca de la actividad *in vivo* del suero del paciente más el antibiótico(s) que está recibiendo para tratar su infección. No obstante, debe tenerse presente que se trata de una prueba realizada *in vitro* y, como tal, se ve influida por todos los factores que afectan a la determinación de la actividad de un

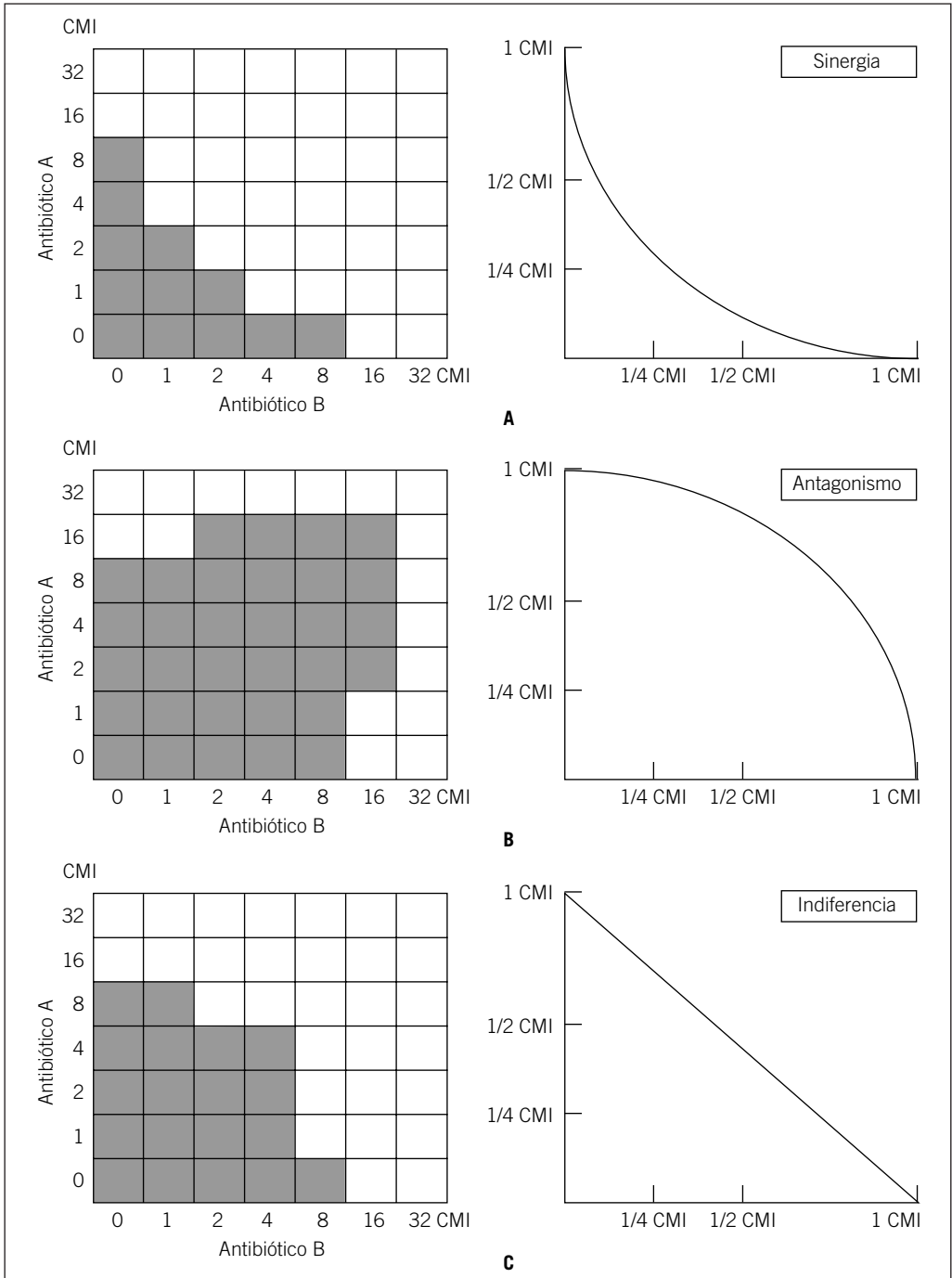


Fig. 2. Método del tablero de ajedrez. Ejemplos de efectos sinérgico (A), antagónico (B) e indiferente (C) obtenidos al combinar dos antibióticos (A + B).

antibiótico además del suero del paciente (por las proteínas que contiene) y el diluyente escogido.

### *Actividad bacteriostática y bactericida del suero*

Schlichter y MacLean<sup>11</sup> fueron los primeros investigadores que utilizaron la determinación de la actividad bacteriostática del suero (ABTS) para valorar la efectividad de la penicilina en el tratamiento de la endocarditis bacteriana. Poco después, Fisher<sup>12</sup> utilizó la actividad bactericida del suero (ABCS) con el mismo propósito. A pesar de su empleo durante muchos años y en diversas enfermedades, la determinación de la ABCS sigue siendo motivo de controversias y de desacuerdos sobre su verdadera utilidad. Con esta prueba se determina la actividad bacteriostática y bactericida del suero del paciente que contiene el antibiótico(s) administrado frente al microorganismo que le produce la infección. El suero se diluye geoméricamente y se añade un inóculo estándar a cada tubo o pocillo antes de su incubación a 35 °C durante 24 h. La actividad bacteriostática del suero (ABTS) es la que corresponde a la dilución más alta que inhibe el crecimiento macroscópico. Después de efectuar subcultivos de aquellos tubos o pocillos sin crecimiento, se determina la dilución más alta que produce una reducción  $\geq 99,9\%$  del inóculo inicial (ABCS). Aunque la prueba puede realizarse por macrodilución, se prefiere el método de microdilución por utilizar menor cantidad de suero y medio de cultivo, requerir menor tiempo para su realización y haber demostrado una buena reproducibilidad<sup>13,14</sup>.

*Dilución del suero.* Dispensar 50  $\mu\text{l}$  del diluyente (aconsejable suero inactivado, pero también se emplea medio de cultivo) en los pocillos 2 a 12. Utilizar otros pocillos para control de esterilidad y crecimiento. Añadir 50  $\mu\text{l}$  del suero a estudiar a los pocillos 1 y 2. Efectuar diluciones dobles.

*Inóculo.* Igual que el empleado para determinar la CMI. Efectuar subcultivos para conocer el inóculo real.

*Inoculación e incubación.* Dispensar 50  $\mu\text{l}$  del inóculo a los pocillos correspondientes. Incubar a 35 °C durante 24 h.

*Lectura de la actividad bacteriostática.* Determinar la dilución más alta del suero en la que no se aprecia crecimiento macroscópico. Calcular el

inóculo empleado mediante el recuento de las colonias. De todos los pocillos en los que no se aprecia crecimiento efectuar subcultivos por duplicado (10  $\mu\text{l}$ ) extendiendo todo el volumen en la superficie de la placa. Incubar las placas 24-72 h según el microorganismo.

*Lectura de la actividad bactericida.* Tras el recuento del número de colonias en las placas, la actividad bactericida del suero corresponderá a la dilución más alta del suero del paciente que reduce el inóculo inicial en un 99,9 % o más.

### **Otras técnicas útiles**

#### *Determinación de las concentraciones de antibióticos en el suero*

La determinación de las concentraciones de antibióticos en el suero resulta de gran utilidad en un modelo experimental de enfermedad infecciosa, ya que permite conocer si el antibiótico administrado alcanza los valores esperados. Esto es especialmente importante cuando se utilizan modelos de farmacocinética humanizada. Aunque se pueden utilizar diversos métodos (HPLC o inmunoanálisis con técnica EMIT)<sup>15</sup> sólo se describirá la metodología necesaria para determinar los valores de los antibióticos en el suero por bioensayo, ya que éste suele ser el método más utilizado en modelos experimentales.

*Preparación de placas de agar.* Como medio de cultivo se suele emplear agar de Mueller-Hinton que una vez esterilizado se dejará enfriar hasta una temperatura de 50-55 °C. A continuación se dispensan 17,5 ml de agar en placas de Petri estériles (diámetro 19 mm) y se deja solidificar. Se añade a 100 ml de medio 1 ml de un inóculo McFarland 0,5 preparado a partir de un cultivo de toda la noche y se dispensan 12,5 ml en cada placa. De esta forma, el inóculo final será de  $10^5$  a  $10^6$  UFC/ml. El microorganismo a utilizar dependerá del antibiótico que se desea medir, pero deberá ser lo suficientemente sensible como para que el nivel de detección inferior sea de 0,5 a 1  $\mu\text{l}$ .

*Preparación del patrón de concentraciones de referencia.* Una vez disuelto el antibiótico, se efectúan las diluciones necesarias para obtener las concentraciones que se utilizarán como estándar. La última dilución (1:1) debe efectuarse con suero de conejo o del animal de nuestro modelo.

*Preparación de las muestras.* El suero obtenido tras centrifugación de la sangre se congela en diversas alícuotas. Se utiliza una alícuota cada vez desechando el suero sobrante.

*Inoculación de las muestras y estándar.* En placas de Petri estériles se colocan diversos discos de papel (especiales para ensayo de antibióticos) sobre los que se depositan 20 µl del suero o del antibiótico estándar. A continuación, y con la ayuda de unas pinzas, se colocarán los discos con las muestras de suero o estándar. En cada placa con muestras de suero debe colocarse un disco con una concentración conocida del antibiótico estándar para poder corregir las variaciones que se produzcan respecto al mismo.

*Incubación.* Se efectúa a 35 °C durante 18-24 h.

*Lectura e interpretación de los resultados.* La lectura de las placas se realiza con la ayuda de un pie de rey midiendo los halos de inhibición alrededor de los discos. A partir de las concentraciones estándar se calcula la recta de regresión ( $\log y = a + bx$ ) correspondiente, a partir de la cual podrán calcularse las concentraciones de las muestras.

*Consideraciones a tener en cuenta.* Los bioensayos se realizan por triplicado y se emplea la media de los tres valores para realizar los cálculos. Debe procurarse que los halos de inhibición de las muestras se encuentren dentro del rango obtenido con el estándar. Si es necesario, se diluirán las muestras para conseguirlo. Debe calcularse el coeficiente de variabilidad inter e intraanálisis de nuestro método mediante repeticiones del mismo bioensayo a lo largo de varios días y en el mismo día.

#### *Cultivo de tejidos*

El cultivo de cualquier tejido infectado en un modelo experimental animal es uno de los parámetros empleados para valorar la eficacia del tratamiento antibiótico utilizado. Puede realizarse de forma cualitativa (hay o no hay crecimiento) o cuantitativa (determinamos el número de UFC/g de tejido y comparamos los resultados según la media ± desviación estándar).

*Procesamiento.* Se extrae el tejido (p. ej., vegetaciones cardíacas) objeto de estudio, se pesa y se homogeneiza en un medio líquido con un volumen conocido (p. ej., caldo de tripticasa-soja). Se

efectúan diluciones del homogeneizado hasta  $10^{-6}$  o  $10^{-7}$  (según la densidad bacteriana esperada) en el mismo medio líquido y se siembra de cada dilución incluido el homogeneizado, 0,1 ml (duplicado) en placas de agar apropiadas según el microorganismo. Tras una incubación de 24-78 h (depende del microorganismo) se realiza el recuento de colonias en cada placa y se calcula el número de bacterias por gramo de tejido según la siguiente fórmula<sup>16</sup>:

$$\text{UFC/g} = \frac{\text{número de colonias} \times \text{dilución} \times 10}{\text{peso tejido} \times (\text{volumen medio} + \text{peso tejido})}$$

Es conveniente sembrar el resto del homogeneizado (residual) en placas de agar invertido para mejorar el límite de detección del método en caso de que el número de UFC/g de tejido sea inferior a  $10^2$ .

## BIBLIOGRAFÍA

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard (4<sup>th</sup> ed.). Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, document M7-A4, 1997, NCCLS.
2. Lorraine T. Broth microdilution MIC testing. En: Isenberg HD, editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington DC: American Society for Microbiology, 1992; 5.2: 1-30.
3. Novak SM. Etest susceptibility testing. En: Isenberg HD, editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington DC: American Society for Microbiology, 1992; 5.2a: 1-17.
4. Amsterdam D. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. En: Lorian V, editor. Antibiotics in Laboratory Medicine (4<sup>th</sup> ed.). Maryland: Williams and Wilkins, 1996; 52-111.
5. Baker CN, Stocker SA, Culverm DH, Thornsberry C. Comparison of E-test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. J Clin Microbiol 1991; 29: 533-538.
6. Pearson RD, Steigbigel RT, Davis HT, Chapman SW. Method for reliable determination of minimal lethal antibiotic concentrations. Antimicrob Agents Chemother 1980; 18: 699-708.
7. Knapp C, Moody JA. Tests to Assess Bactericidal Activity. En: Isenberg HD, editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington DC: American Society for Microbiology, 1992; 5.16: 1-33.
8. Peterson LR, Shanholtzer CJ. Tests for bactericidal effects of antimicrobial agents: technical performance and clinical relevance. Clin Microbiol Rev 1992; 5: 420-432.

9. Eliopoulos GM, Moellering Jr RC. Antimicrobial combinations. En: Lorian V, editor. *Antibiotics in Laboratory Medicine* (4ª ed.). Maryland: Williams and Wilkins, 1996; 330-396.
10. Moody JA. Synergism Testing: Broth Microdilution Checkerboard and Broth Macrodilution Methods. En: Isenberg HD, editor. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Washington DC: American Society for Microbiology, 1992; 5.18: 1-28.
11. Schlichter JG, MacLean H. A method for determining the effective therapeutic level in the treatment of subacute bacterial endocarditis with penicillin: a preliminary report. *Am Heart J* 1947; 34: 209-211.
12. Fisher AM. A method for determination of antibacterial potency of serum during therapy of acute infections. Preliminary report. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1952; 90: 313-319.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methodology for the serum bactericidal test* (2ª ed.). Villanova, PA: Document M21T. Tentative guideline, 1992, NCCLS.
14. Griffin J. Serum Inhibitory and Bactericidal Titers. En: Isenberg HD, editor. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Washington DC: American Society for Microbiology, 1992; 5.17: 1-19.
15. Klassen M, Edberg SC. Measurement of antibiotics in human body fluids: techniques and significance. En: Lorian V, editor. *Antibiotics in Laboratory Medicine* (4ª ed.). Maryland: Williams and Wilkins, 1996; 230-295.
16. Loeb EC, Marvin JA, Heck EL, Curreri PW, Baxter, CR. The method of quantitative burn wound biopsy cultures and its routine use in the care of the burned patient. *Am J Clin Pathol* 1974; 61: 20.

## DISCUSIÓN

J.M. MIRÓ: ¿Qué criterios utilizarías en el laboratorio para poder seleccionar aquellas combinaciones de antibióticos o aquellos antibióticos que evaluarías en un modelo *in vivo*?

F. MARCO: Depende del objetivo que se pretenda. Si se quiere evaluar un fármaco nuevo frente a una pauta ya conocida, probablemente lo primero que hay que hacer es una determinación de la CMI y de la CMB. Si únicamente vamos a evaluar un antibiótico, no es necesario hacer nada más. En el supuesto de analizar combinaciones de fármacos conocidos que aún no se han estudiado, aparte de la CMI y de la CMB, es evidente que se requieren otras pruebas como una curva de letalidad, que ofrece más información sobre la dinámica de actividad de los antibióticos frente a la bacteria que se está estudiando.

J. GAVALDÀ: Últimamente se ha publicado una normativa de la Sociedad Americana de Microbiología que actualiza el concepto de sinergia y acepta que sólo se puede hablar de sinergia cuando uno de los antibióticos utiliza una concentración que no inhibe el crecimiento de la bacteria. Por ello, en muchas de las curvas que aparecen habitualmente en la bibliografía no se podría hablar de sinergia. ¿Cuál es vuestra opinión al respecto?

F. MARCO: Es evidente que cuando se realiza una curva de letalidad si el antibiótico más activo es bactericida, la curva ya no es de utilidad si lo que se pretende es efectuar un análisis de la sinergia entre diferentes antibióticos.

J. GAVALDÀ: Mi comentario venía a raíz del último artículo que publicamos en marzo sobre las combinaciones de ampicilina y ceftriaxona, en el que Barbara Murray, editora de la revista, no

aceptó de ninguna de las maneras el concepto de sinergia de la combinación, a pesar de que la combinación bajaba tres y cuatro logaritmos el efecto de los fármacos individualmente. Tuvimos que reinventar el término de "cooperación antimicrobiana entre fármacos" para sustituir al de sinergia.

J.M. GATELL: Me ha llamado la atención que todavía estéis utilizando de una manera tan extensa el bioensayo para determinar las concentraciones de antibióticos. Actualmente en los laboratorios de farmacología se emplean métodos como la HPLC u otros más precisos y menos engorrosos. ¿Esto se debe a que lo reserváis sólo para antibióticos muy raros en los cuales no se dispone de otro método, o simplemente utilizáis el bioensayo como método más cómodo para vosotros?

F. MARCO: La HPLC es un sistema con un nivel de detección mucho mejor y menos subjetivo que el bioensayo, por lo que es el método más recomendable. Sin embargo, hay antibióticos en los cuales todavía no está desarrollado el sistema de detección por HPLC o no existe la posibilidad de utilizarlo; en estos casos, la alternativa suele ser el bioensayo.

J.L. RODRIGUEZ TUDELA: Me gustaría añadir la siguiente consideración sobre el tema del bioensayo y es que, al menos en el campo de los antifúngicos, es recomendable aplicar ambos métodos. Hay algunos antifúngicos que producen metabolitos activos, como es el caso del itraconazol, con los que se ha observado una mejor correlación *in vitro-in vivo* con el bioensayo que con HPLC, a no ser que se determinen itraconazol e hidroxitraconazol.

J.M. MIRÓ: Lo que ha explicado Francesc Marco sirve fundamentalmente para las bacterias, ¿crees que es aplicable también para los hongos habituales (*Candida*, *Aspergillus*, etc.)?

J.L. RODRÍGUEZ TUDELA: En el campo de los antifúngicos nos encontramos todavía en la infancia de lo que se ha explicado. Con determinados fármacos tenemos una idea más o menos acertada de lo que significa la CMI dentro del labo-

ratorio, pero tenemos poca idea de lo que significa la CFM. Se están empezando a hacer otras determinaciones como las curvas de letalidad, aunque la discusión sigue abierta en cuanto al inóculo a utilizar (las recomendaciones son diferentes según el país). Nuestra intención es acercarnos un poco más al nivel existente en investigación sobre bacterias, pero creo que todavía queda mucho camino por recorrer.



---

# Modelos experimentales en farmacodinamia

---

Fernando Fuentes Martínez<sup>a</sup>, María José Giménez Mestre<sup>b</sup>  
y José Prieto Prieto<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.

<sup>b</sup>Departamento Médico. SmithKline Beecham S.A. Madrid.

---

## RESUMEN

La farmacodinamia estudia los efectos que los cambios en la concentración de un antimicrobiano inducen sobre los microorganismos. Este amplio campo de investigación puede ser dividido en dos apartados distintos, según la finalidad u objetivo del estudio: por un lado se hallarían los estudios de predicción de eficacia, que tratarían de encontrar parámetros que puedan proporcionar una indicación de la actividad del compuesto. De otra parte, se contaría con ensayos dirigidos a determinar uno o más parámetros de tipo farmacodinámico, como pueden ser el efecto postantibiótico o los efectos de concentraciones subinhibitorias sobre los microorganismos. Cada uno de estos apartados incluye modelos y técnicas tanto *in vitro*, como *ex vivo* o *in vivo*. Para el estudio de parámetros o indicadores de eficacia se utilizan modelos muy estandarizados y aceptados, como las simulaciones farmacocinéticas *in vitro*, la determinación de títulos bactericidas séricos o los modelos *in vivo* de sepsis intraabdominal, neumonía o lesión en el muslo de ratón. Sin embargo, para la determinación de parámetros farmacodinámicos específicos la estandarización es menor; tanto los modelos *in vitro* (curvas de muerte bacteriana modificadas) como *in vivo* (modelos de meningitis, endocarditis, lesión en muslo de ratón o neumonía) tienen metodologías variables y no permiten comparaciones significativas. Tanto los modelos *in vitro* como *ex vivo* presentan la ventaja de la comodidad y de la reproducibilidad, mientras que los estudios *in vivo* concuerdan más con la realidad clínica. Todos estos modelos han sido aplicados ampliamente en el estudio de numerosos antimicrobianos, y se han obtenido resultados muy interesantes.

### Palabras clave:

Farmacodinamia. Farmacocinética. Efecto postantibiótico.

---

## PHARMACODYNAMIC EXPERIMENTAL MODELS

Pharmacodynamics studies the effects that changes in antimicrobial concentrations induce on microorganisms. This investigational field of antimicrobial agents may be divided in two different areas according to the objectives/end-points to be studied: first, those studies of efficacy prediction, designed to determine parameters that provide information about the activity of the compound; second, those studies designed to investigate one or more pharmacodynamic parameters, such as the post-antibiotic effect or the effect of sub-inhibitory concentrations on microorganisms. Several standardised and wide-accepted techniques are used to determine activity predictor parameters, such as *in vitro* pharmacokinetic simulations, determination of serum bactericidal titres, or *in vivo* models including intraabdominal sepsis, pneumonia or thigh infection model in mice. Nevertheless, to determine specific pharmacodynamic parameters, lower standardised models have been used, and both *in vitro* (modified bactericidal curves) and *in vivo* (meningitis, endocarditis, pneumonia or thigh lesion models) have variable methodology that do not allow significant comparisons among them. The advantages of *in vitro* and *ex vivo* models are their high reproducibility and relative ease, while *in vivo* models are more closely related to clinical outcome. All these models have been widely applied in the study of antimicrobial agents, and a high number of interesting results have been obtained.

### Key words:

Pharmacodynamic. Pharmacokinetic. Post-antibiotic effect.

---

\*Correo electrónico: jprieto@eucmax.sim.ucm.es.

**TABLA I**  
**CLASIFICACIONES DE LOS MODELOS**  
**EXPERIMENTALES UTILIZADOS EN**  
**FARMACODINAMIA ATENDIENDO**  
**A DIVERSOS PARÁMETROS**

---

Atendiendo a su finalidad
Modelos de predicción de eficacia
Modelos de evaluación de parámetros farmacodinámicos
Según su desarrollo
<i>In vitro</i>
<i>In vivo</i>
<i>Ex vivo</i>
Según la etapa de estudio del antimicrobiano
Modelos de cribado o de actividad frente a determinados grupos de patógenos (grampositivos, gramnegativos, etc.)
Modelos de determinación de eficacia de distintas dosificaciones
"Clásica"
Modelos básicos de cribado
Modelos <i>ex vivo</i>
Modelos monoparamétricos
Modelos discriminativos

---

## Introducción

Los antimicrobianos, al contrario de los demás fármacos utilizados en otros campos de la medicina, tienen su diana en receptores que no son células o tejidos del propio paciente, sino de los microorganismos causantes de la infección. Esta diferencia básica conlleva una mayor complejidad en el estudio de la actividad de estas sustancias, ya que deben realizarse los estudios teniendo en cuenta tres componentes interactuantes: el paciente, el microorganismo y el antimicrobiano.

La *farmacodinamia* estudia la relación existente entre los cambios en la concentración del antimicrobiano y la respuesta que éstos tienen sobre el microorganismo. Desde hace algunas décadas, la farmacodinamia ha cobrado una gran importancia en el campo del estudio de los antimicrobianos, debido principalmente a dos hechos: la capacidad de obtener datos que pueden ser tomados como "predictores" de la eficacia del antimicrobiano (cociente inhibitorio, área sobre la curva/concentración mínima inhibitoria [CMI], etc.) y la posibilidad de estudiar ciertos parámetros que pueden ser utilizados en el diseño y mejora de los regímenes de dosificación

de los antimicrobianos (efecto postantibiótico [EPA] o efecto de concentraciones subinhibitorias, entre otros).

Para el estudio de la farmacodinamia de los antimicrobianos se han utilizado multitud de modelos experimentales, muchos de los cuales se emplean también en el estudio de otras características de los procesos infecciosos (evolución de la infección, etc.).

## Tipos de modelos

Estos modelos pueden clasificarse de distintas formas, atendiendo a diversas variables, como se describe en la tabla I. Pueden dividirse en modelos *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*, pero, además de esta clasificación, pueden agruparse según su finalidad: la predicción de eficacia y actividad o el estudio de parámetros determinados (EPA, sub-CMI, etc.). Existen otras clasificaciones "clásicas" de los modelos experimentales *in vivo* que son ampliamente aceptadas, como la de Zak et al<sup>1</sup>, quienes prefieren agruparlos de la siguiente forma:

1. *Modelos básicos de cribado de antimicrobianos*: se utilizan como primeras investigaciones de un antimicrobiano, incluyéndose modelos como el de sepsis intraabdominal, neumonía, meningitis y lesión en el muslo en ratones.

2. *Modelos ex vivo*: permiten, mediante el implante de dispositivos (cámaras de diálisis o coágulos de fibrina) medir una serie de parámetros como la tasa de muerte, los cambios en la morfología bacteriana o las concentraciones de antimicrobiano de forma fácil y cómoda.

3. *Modelos monoparamétricos*: se refieren a modelos en los que se estudia de forma intensiva un solo parámetro o variable. Similares a los de cribado, son empleados en estados más avanzados de estudio de un compuesto antimicrobiano.

4. *Modelos discriminativos*: son los más complicados técnicamente, y están diseñados para tener una aproximación lo más real posible a los procesos infecciosos en humanos.

En el estudio de la farmacodinamia de los antimicrobianos se utilizan múltiples modelos experimentales. Para su mejor descripción, se utilizará la clasificación mencionada anteriormente de *modelos farmacodinámicos para predicción de eficacia* y *modelos monoparamétricos de estudio de variables farmacodinámicas aisladas*. Cada uno de estos apartados incluye tanto modelos *in vitro* como *in vivo* o *ex vivo* (tabla II).

**TABLA II**  
**RESUMEN ESQUEMÁTICO DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES Y TÉCNICAS *IN VITRO***  
**UTILIZADAS EN EL ESTUDIO DE LA FARMACODINAMIA DE ANTIMICROBIANOS**

<i>Variable de estudio</i>	<i>In vitro</i>	<i>Ex vivo</i>	<i>In vivo</i>
Predicción de eficacia	<p>Curvas de muerte bacteriana (concentración constante)</p> <p>Curvas de muerte bacteriana (simulación farmacocinética)</p>	<p>Determinación título séricos</p> <p>Actividad bactericida sérica en curvas de muerte bacteriana</p>	<p>Modelo de sepsis intraperitoneal en ratones</p> <p>Modelo de neumonía en ratones</p> <p>Modelo de infección en el muslo de ratón neutropénico</p>
Efecto postantibiótico	<p>Curvas de muerte bacteriana <i>in vitro</i> con eliminación del antimicrobiano por dilución, inactivación o centrifugación</p>		<p>Modelo de infección en muslo de ratón neutropénico</p> <p>Modelo de meningitis en conejos</p> <p>Modelo de endocarditis en ratas</p> <p>Modelo de cámaras en conejos</p> <p>Modelo de piezas de algodón en ratones</p>
Efecto de concentraciones subinhibitorias	<p>Curvas de muerte bacteriana <i>in vitro</i> con eliminación del antimicrobiano por dilución, inactivación o centrifugación. Adición de concentraciones sub-CMI</p>		<p>Los mismos que en el apartado anterior pero con simulaciones farmacodinámicas</p>
Efecto sobre la morfología bacteriana	<p>Observación de células bacterianas tras exposición: en medios líquidos o sobre superficies sólidas o semisólidas</p>		<p>Observación de células bacterianas tras: infección intraperitoneal o meningitis en conejos</p>
Efecto sobre la producción de factores de virulencia	<p>Producción de exotoxina A, elastasa, fosforilasa, lipopolisacáridos</p>		
Efecto sobre la adherencia bacteriana	<p>A células epiteliales del tracto urinario</p> <p>A superficies plásticas</p>		
Inmunomodulación		<p>Adherencia, quimiotaxis, fagocitosis</p> <p>Efecto posleucocitario (fase EPA)</p>	

### *Modelos utilizados en la predicción de eficacia*

*Modelos in vitro.* Se emplean principalmente de forma exploratoria y ofrecen una información amplia sobre los posibles efectos del antimicrobiano. Destacan por su importancia los siguientes:

1. *Curvas de muerte bacteriana.* Generalmente, la técnica más empleada en el estudio farmacodinámico de un antimicrobiano. Esta técnica simple, en la que se enfrenta un microorganismo a concentraciones constantes de un antimicrobiano en condiciones de crecimiento óptimas, es uno de los primeros pasos a llevar a cabo en la investigación de la actividad “dinámica” de un compuesto, después de conocer, obviamente, su actividad “estática” (CMI o concentración mínima bactericida [CMB]). Sobre esta técnica se puede, sin embargo, incluir una serie de variantes que pueden ofrecer una dimensión más amplia y adaptada a la realidad *in vivo* (ensayo en presencia de células polimorfonucleares [PMN])<sup>2,3</sup>. En estas curvas se pueden obtener diversos resultados, el más interesante de los cuales es el *porcentaje de reducción del inóculo inicial* a distintos tiempos del ensayo (la duración en total suele ser de 8-12 h) con distintas concentraciones (desde 1 a 10 o 20 veces la CMI).

2. *Curvas de muerte bacteriana con simulaciones farmacocinéticas.* La exposición a concentraciones constantes de antimicrobiano no muestra lo que realmente ocurre *in vivo*, donde los valores de estos compuestos son cambiantes a lo largo del intervalo de dosificación. Existen varios modelos que “simulan” estos valores, obteniéndose resultados más comparables y ajustados a la realidad: sistemas de “cultivo continuo”<sup>4</sup> (mediante bombas peristálticas) y sistemas de filtración-centrifugación<sup>5,6</sup>, como el Centriprep-10, en los que a distintos tiempos se elimina el antimicrobiano por filtración-centrifugación, añadiendo una nueva concentración hasta el siguiente tiempo, en el que se repite el proceso.

Al igual que en el caso anterior, la finalidad y objeto del estudio es observar la cinética de muerte bacteriana medida por la reducción del inóculo inicial, pero permiten establecer una relación con parámetros farmacocinéticos determinados previamente (relación con tiempo sobre CMI [ $T > CMI$ ] o área bajo la curva [ABC], etc.).

*Modelos ex vivo.* Se considera dentro de este grupo a los modelos que emplean técnicas *in vitro* para estudiar muestras obtenidas *in vivo*. Se enumeran a continuación los más relevantes:

1. *Títulos bactericidas séricos*<sup>7,8</sup>. Es quizá una de las técnicas que más se valoran en el estudio de la actividad de un antimicrobiano. Es una forma de “titulación” de la actividad que incluye como factores la concentración del antimicrobiano y su CMI frente al microorganismo. Se emplea generalmente para su determinación el suero de voluntarios que han recibido una dosis del antimicrobiano, y se obtiene la dilución máxima del suero que es capaz de matar al 99,9 % de las bacterias (con un período de incubación de 24 h), realizándose comparaciones según el tiempo de extracción del suero y la concentración de antimicrobiano.

2. *Actividad bactericida sérica en curvas de muerte bacteriana*<sup>9</sup>. De forma semejante a las curvas de muerte bacteriana con PMN descritas en los modelos *in vitro*, en este modelo se añade al cultivo de microorganismos el suero de voluntarios que han recibido una dosis del antimicrobiano, en vez de exponer éste directamente al antimicrobiano. Se valora de esta forma la reducción del inóculo en vez de establecer un título bactericida del suero, observándose hechos farmacodinámicos que tienen efecto en tiempos cortos (duración del ensayo de 2-4 h). Al mismo tiempo se puede estudiar si la acción de los PMN aumenta la muerte bacteriana en presencia del antimicrobiano, comparando la reducción del inóculo de curvas con suero de voluntarios más PMN y una curva con sólo células PMN y microorganismos.

*Modelos in vivo.* Como se ha comentado anteriormente, los modelos *in vivo* de predicción de eficacia mediante evaluaciones de la farmacodinamia de un antimicrobiano pueden estudiar diversos parámetros que actuarían como predictores de eficacia. Dado el elevado número de modelos en animales y teniendo en cuenta el posterior desarrollo de muchos de ellos en otros capítulos, se enumerarán a continuación los que permiten el estudio de un mayor número de microorganismos (más inespecíficos), debido al tipo de infección que se causa al animal.

1. *Modelo de sepsis intraperitoneal en ratones*<sup>7,10</sup>. Este modelo se utiliza ampliamente como primera indicación de actividad *in vivo* de un compuesto. Su finalidad es cuantificar la supervivencia de ratones infectados intraperitonealmente con un inóculo alto y capaz de matar al animal en pocos días u horas. En principio se utiliza para determinar parámetros como la dosis efectiva que protege al 50 % de los ratones ( $DE_{50}$ ). Sin embargo, en estadios más avanzados de es-

tudio de un antimicrobiano la dosificación se puede diseñar de forma que simule la de humanos y la determinación de las concentraciones del antimicrobiano en el suero permite una comparación de parámetros farmacocinéticos con porcentaje de supervivencia.

2. *Modelo de neumonía en ratones*<sup>11</sup>. La finalidad es la misma que la del modelo anterior, y también se pueden utilizar un gran número de microorganismos capaces de producir infecciones en el pulmón o neumonías. En muchas ocasiones, los ratones son inmunodeprimidos mediante inyección de ciclofosfamida o irradiación, aumentando la capacidad invasiva del patógeno. Además de la supervivencia, se puede realizar también un recuento de bacterias en los pulmones de los animales a distintos tiempos.

3. *Modelo de infección en el muslo de ratón neutropénico*<sup>12,13</sup>. Resulta técnicamente sencillo y poco complejo, y se puede utilizar en diversas determinaciones de parámetros farmacodinámicos, como se verá a continuación en otros apartados. En este modelo se causa una infección intramuscular en el muslo de ratones inmunodeprimidos; los animales son tratados con el antimicrobiano, y durante un período corto (8-16 h), se realizan recuentos de bacterias viables en el muslo homogeneizado de los ratones sacrificados cada hora o cada 2 h. Como en los anteriores, el diseño de los regímenes de dosificación (número de dosis, concentración, etc.) permite una correlación entre la eficacia (medida como reducción de unidades formadoras de colonias [UFC] en el muslo) y los distintos parámetros farmacocinéticos (determinados en el suero del ratón).

#### *Modelos utilizados en la determinación de parámetros farmacodinámicos*

Existen multitud de parámetros o variables de tipo farmacodinámico que determinan la actividad de los antimicrobianos. Muchos de ellos son específicos en cuanto a los microorganismos, y la mayoría están relacionados con el mecanismo de acción del compuesto frente a la bacteria. A continuación se describen brevemente los modelos experimentales que se han desarrollado para estudiar cada uno de ellos.

*Efecto postantibiótico (EPA)*. Se ha definido el EPA como la supresión persistente del crecimiento bacteriano tras la exposición a una sustancia antimicrobiana. De esta forma, todos los modelos empleados en su estudio han "aprovechado" técnicas tanto *in vitro* como *in vivo* en las

que se "expone" el microorganismo al antimicrobiano, retirando éste después y cuantificando el crecimiento bacteriano en su ausencia.

Las técnicas más sencillas son las desarrolladas *in vitro*. Análogamente a las descritas en las curvas de muerte bacteriana, el microorganismo se expone a concentraciones constantes del antimicrobiano durante un tiempo corto (de 1 a 2 h) generalmente en caldo, procediéndose entonces a la retirada de éste. Para este procedimiento, se utilizan principalmente tres técnicas: *dilución*, *inactivación por enzimas* (sólo para betalactámicos) y *centrifugación*. Tras este proceso se realizan recuentos bacterianos para cuantificar el retraso en el crecimiento, comparándolo con cultivos control sin exposición previa al antimicrobiano<sup>14</sup>.

Sin embargo, el estudio *in vivo* de este parámetro permite una mejor aproximación a la realidad clínica. Para su estudio en animales se han empleado los siguientes modelos.

1. *Modelo de infección en el muslo de ratón neutropénico*<sup>12,13</sup>. Descrito ya en el apartado anterior, es tal vez el más utilizado. Para estudiar el EPA, los ratones infectados son tratados con dosis bajas del antimicrobiano que aseguran una exposición corta del microorganismo. Al determinar las concentraciones del antimicrobiano en el suero, se puede calcular cuándo descienden de la CMI y, por tanto, el posible retraso en el crecimiento del inóculo.

2. *Modelo de meningitis en conejos*. Autores como Sande et al<sup>15</sup> pusieron este modelo en práctica para estudiar el efecto de una sola dosis de ampicilina sobre *Streptococcus pneumoniae*.

3. *Modelo de endocarditis en ratas*. En este modelo, utilizado también por varios autores<sup>16</sup>, se produce una endocarditis en las válvulas aórtica o tricúspide. Un día más tarde se administra el antimicrobiano por vía intramuscular y posteriormente se determinan el número de UFC y la concentración del antimicrobiano en las vegetaciones producidas en las válvulas.

4. *Modelo de cámaras en conejos*. Este modelo es, tal vez, el menos utilizado<sup>17</sup>. Se utilizan cámaras de acero en forma de red (*tissue cage fluid*) que contienen un tampón (*buffer*) y que son implantadas 4 semanas antes del experimento en la espalda de conejos sanos. Tras establecerse un equilibrio entre los líquidos intersticiales y de la cámara, el día del experimento se introduce en la cámara el inóculo que previamente han sido expuesto a la acción de antimicrobiano *in vitro*.

5. *Modelo de piezas de algodón en ratones.* Renneberg y Walder<sup>18</sup> han puesto a punto este modelo que, junto con el de infección en el muslo, son probablemente los mejor estandarizados. En vez de cámaras, se colocan piezas de algodón inoculadas bajo la piel de ratones.

En todos estos modelos, la determinación del EPA se realiza por recuento de UFC en el lugar de la infección, observando la diferencia entre animales controles y tratados. El principal problema está en distinguir el EPA del efecto de las concentraciones sub-CMI, siempre presentes tras un tratamiento.

*Efecto de las concentraciones subinhibitorias sobre el crecimiento bacteriano.* Las concentraciones subinhibitorias actúan de distinta manera sobre las bacterias en fase de crecimiento logarítmico, fase estacionaria o microorganismos previamente expuestos a la acción del antimicrobiano (fase de EPA)<sup>19</sup>.

Los modelos *in vitro* son los mismos que se han descrito para el EPA, con la diferencia de que tras la eliminación del antimicrobiano se añaden concentraciones subinhibitorias para observar su actividad sobre bacterias controles (ECS) o en fase de EPA (ECS-EPA).

En cuanto a los modelos en animales, se han utilizado también varios de los modelos descritos anteriormente para el estudio del EPA *in vivo* (infección en el muslo de ratón, neumonía, implante de piezas de algodón o cámaras en conejos). El posible efecto de estas concentraciones sub-CMI se observaría al inocular bacterias cuando las concentraciones de antimicrobiano han descendido de la CMI, y cuantificar su crecimiento.

*Efectos sobre la morfología bacteriana.* Los cambios en la morfología de las bacterias se han estudiado tanto con microscopio de luz como electrónico, ya que este segundo medio permite la observación de alteraciones en la ultraestructura de las células<sup>20</sup>. Los modelos experimentales utilizados *in vitro* se pueden dividir en dos categorías: *estudios en medios líquidos o sobre superficies sólidas o semisólidas* (exposición a discos de antimicrobiano o colocación de membranas con microorganismos sobre placas de agar con concentraciones sub-CMI).

En cuanto a los modelos *in vivo*, el modelo más utilizado ha sido, por su sencillez y comodidad, el de infección intraperitoneal<sup>21</sup>. En este caso, el tratamiento debe ser corto, para permi-

tir una tasa de muerte bacteriana baja, recuperando el microorganismo del líquido peritoneal cuando las concentraciones del antimicrobiano en suero se encuentren por debajo de la CMI. Se pueden utilizar otros modelos, como el de meningitis en conejos anteriormente descrito, ya que permitiría una monitorización en el propio líquido cefalorraquídeo de las concentraciones del antimicrobiano.

#### *Otros efectos farmacodinámicos sobre los microorganismos*

1. *Efectos sobre la adherencia a superficies.* Algunos modelos permiten el estudio de la adherencia de microorganismos a diversas superficies tras ser tratados con antimicrobianos. En concreto, se han utilizado superficies como células epiteliales del tracto urinario y superficies plásticas<sup>22</sup>.

2. *Efectos sobre la producción de factores de virulencia.* Se ha observado la supresión por parte de eritromicina en concentraciones sub-CMI de la producción *in vitro* de exotoxina A, elastasa y fosforilasa de algunos microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*<sup>23</sup>. Cepas con cápsula mucosa y no mucosa de esta misma especie han sido expuestas a la acción de concentraciones sub-CMI de aminoglucósidos, betalactámicos y ciprofloxacino, observándose en los primeros una reducción de la excreción de la cápsula de alginato y de sideróforos quelantes de acero.

3. *Efectos inmunomoduladores.* Dentro de este apartado se puede estudiar (con técnicas *ex vivo*) el efecto que los antimicrobianos inducen en los microorganismos y que influyen en las funciones de las células defensivas (PMN y macrófagos). En concreto, se pueden observar modificaciones tanto en la quimiotaxis como en la adherencia, fagocitosis o muerte intracelular mediante la preexposición de los microorganismos al antimicrobiano. También se han estudiado extensamente mediante estas técnicas el efecto postantibiótico leucocitario o la mayor susceptibilidad de las bacterias a ser fagocitadas cuando se encuentran en fase de EPA.

#### **Ventajas y limitaciones**

Todos los modelos experimentales expuestos anteriormente presentan una serie de ventajas e inconvenientes que condicionan su desarrollo. Por un lado, pueden señalarse diferencias inherentes a su naturaleza (estudios *in vitro* o *in vivo*) y posteriormwnte puede distinguirse entre los

TABLA III  
 PRINCIPALES VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LOS MODELOS *IN VITRO*, *EX VIVO* E *IN VIVO*

	In vitro	Ex vivo	In vivo
Ventajas	Comodidad Rapidez en la obtención de resultados Alta reproducibilidad Técnicas estandarizadas y aceptadas	Las mismas que <i>in vitro</i> Mayor aproximación a la realidad <i>in vivo</i> Capacidad de "cuantificar" la actividad (p. ej., títulos séricos) y compararla luego <i>in vivo</i>	Infecciones controladas y reproducibles Identificación rápida de falta de actividad <i>in vitro</i> Interacción de multitud de variables que influyen en la eficacia
Limitaciones	Sólo ofrecen indicaciones de actividad, y de forma generalizada Aún en simulaciones, ponen en juego pocas variables farmacodinámicas	Aunque más que <i>in vitro</i> , no responden a cuestiones específicas, sólo generales Más complejas que las <i>in vitro</i> por la necesidad de extraer células y/o fluidos humanos o animales	Laboriosidad y necesidad de instalaciones específicas Infecciones a menudo poco naturales (infecciones fulminantes y artificiales) Farmacocinética poco similar a la de humanos Modelos a veces poco estandarizados (en EPA, sub-CMI, morfología)

modelos que presentan un mejor ajuste a la realidad que se pretende conocer.

*Estudios in vitro o in vivo*

La principal ventaja de los estudios *in vitro* es, obviamente, su menor laboriosidad y su capacidad de obtener resultados más rápidamente y con una mayor reproducibilidad que los modelos *in vivo*. Sin embargo, estas técnicas *in vitro* sólo pueden ofrecer resultados de forma aproximada, ya que el número de variables que se tienen en cuenta son limitadas. Cabe destacar la mayor aproximación a la realidad *in vivo* mediante los sistemas de simulación farmacocinética, muy utilizados actualmente en detrimento de los modelos que emplean concentraciones "constantes" de antimicrobianos.

Un paso adelante lo componen sin duda los sistemas y modelos *ex vivo*, que medirían mediante técnicas *in vitro* los efectos de fluidos y/o células humanas (PMN o suero), y cuya principal ventaja es la capacidad de "cuantificar" la actividad de un antimicrobiano (p. ej., ofreciendo su título bactericida sérico). Tal vez la mayor ventaja de estos modelos es la superior estandarización de las técnicas que se utilizan, siendo ésta una de las desventajas de los modelos *in*

*vivo*, sobre todo de los que se emplean en la determinación de algunos parámetros farmacodinámicos.

Si bien los modelos *in vivo* tienen una mayor aproximación a la realidad clínica, es también cierto que deberían servir para responder a cuestiones específicas más que para dar una idea global de la actividad o eficacia de un antimicrobiano. Los modelos *in vivo* que estudian la predicción de eficacia son muy utilizados y la comparación de datos es fiable, pero otros, como los empleados en la determinación del EPA, no han sido lo suficientemente estandarizados como para que los datos puedan reflejar más diferencias significativas entre antimicrobianos que entre los propios modelos. Además, las diferencias entre la farmacocinética de animales y humanos debe ser tenida en cuenta a la hora de establecer comparaciones, ya que son en general muy diferentes<sup>1</sup>. En la tabla III se resumen las principales ventajas y limitaciones en el uso de modelos tanto *in vitro* como *ex vivo* e *in vivo*.

*Estudios de predicción de eficacia*

Es en este campo en el que existe una mayor estandarización en cuanto a todos los modelos empleados, ya que se trata de técnicas utilizadas

habitualmente en el estudio de antimicrobianos y de amplia difusión. Todos ellos son imprescindibles en el estudio de antimicrobianos, ya que ofrecen una idea de la actividad de un producto. Por tanto, sus ventajas principales son su rapidez y el alto número de datos que se pueden obtener en poco tiempo. Sin embargo, estos estudios, como se apuntaba anteriormente, deben complementarse de forma inevitable con estudios más detallados en infecciones similares a las producidas en clínica humana.

### Estudios de parámetros farmacodinámicos

El gran interés despertado hace unas décadas por el estudio de ciertos parámetros farmacodinámicos como el EPA contribuyó a que se desarrollaran un gran número de modelos tanto *in vitro* como *in vivo*. De esta forma, los numerosos datos obtenidos sobre la mayoría de los antimicrobianos no permiten su comparación de forma significativa. El EPA de un antimicrobiano puede ser diferente en duración según el modelo utilizado<sup>14</sup>, existiendo notables diferencias entre los valores obtenidos *in vitro* e *in vivo* (más altos generalmente en este último caso). Los modelos *in vivo*, además, pueden subestimar los efectos de concentraciones subinhibitorias, que falsearían el EPA<sup>14</sup> como se ha demostrado en alguna ocasión<sup>24</sup>.

Como ejemplo de esta falta de estandarización o establecimiento de un protocolo unitario destaca que las fórmulas para determinar la duración de estos efectos suelen variar ampliamente de un modelo a otro, lo que ha llevado a la imposibilidad de comparación de resultados. Es en este grupo de modelos en los que sí puede aplicarse la característica de ser "indicadores" de parámetros clínicos, ya que ofrecen una idea aproximada de lo que se pretende cuantificar.

### Aplicabilidad

Dado el elevado número de estudios realizados con los modelos expuestos anteriormente, en este apartado realizaremos un resumen del ámbito de aplicación de estos modelos y técnicas, resaltando principalmente la experiencia de los autores en este campo, con una sinopsis de lo que ha sido y es el estudio de la farmacodinamia de los antimicrobianos.

En primer lugar, destaca la enorme importancia que tienen actualmente los datos de predicción de actividad en el estudio de la eficacia de un antimicrobiano. Todos los modelos de estudio en este apartado conducen al establecimiento de

patrones de actividad frente a los microorganismos. Para la determinación de estos patrones, se siguen habitualmente una secuencia de tipo lógico en los ensayos a realizar<sup>1</sup>:

1. Demostración *in vitro* de la disminución de masa bacteriana (o inóculo inicial) mediante curvas de muerte (preferentemente en simulaciones farmacocinéticas).
2. Demostración *ex vivo* y/o *in vivo* de esta capacidad *in vitro* mediante los modelos de supervivencia enumerados en apartados anteriores.
3. Posible extrapolación a humanos.

Como ejemplo pueden citarse los estudios realizados para explicar la eficacia de las penicilinas (en concreto de amoxicilina) sobre cepas de *S. pneumoniae*, aun cuando la tasa de resistencia de este microorganismo a betalactámicos es cada vez más preocupante. Mediante estudios *in vitro* e *in vivo* se ha podido determinar la eficacia de amoxicilina incluso con una cepa de neumococo resistente a penicilina, utilizando para ello la mayoría de los modelos tanto *in vitro* como *in vivo* que ya hemos descrito. En otros casos se puede establecer una relación entre la observación de uno o más parámetros farmacodinámicos y su capacidad para influir en la actividad de un compuesto. De esta forma, en otros estudios hemos empleado modelos como el de lesión en el muslo de ratón neutropénico para comprobar si la duración del EPA podía influir en los regímenes de dosificación de varios antimicrobianos<sup>25,26</sup>, observándose que en compuestos con EPA no significativo (como algunos betalactámicos) los regímenes con dosificaciones más espaciadas eran poco eficaces en relación con antimicrobianos que sí tenían EPA (macrólidos o quinolonas).

A este respecto, debe citarse como aplicación realmente interesante los trabajos de Vogelmann et al con este mismo modelo *in vivo*, en el que correlacionaron parámetros farmacocinéticos con la eficacia de varios compuestos de distintas clases de antimicrobianos<sup>13</sup>. Frente a varios microorganismos y utilizando varias dosificaciones distintas, se establecieron correlaciones entre el tiempo sobre CMI o CMB, ABC, etc., con los recuentos de bacterias en el muslo de los ratones, estableciendo indicadores de eficacia con los que poder ayudar en el diseño de regímenes de dosificación en humanos. De forma similar, se han realizado estudios con otros modelos como el de neumonía en ratones, relacionando farmacocinética y eficacia en recuentos de UFC en el pulmón<sup>11</sup>.



Entrando en el campo del estudio de parámetros farmacodinámicos, se han aplicado los modelos descritos a un gran número de antimicrobianos. Existen amplias revisiones de los valores tanto de EPA como de otros efectos relacionados (concentraciones subinhibitorias o morfología) con modelos tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>14</sup>, si bien estos trabajos se llevan a cabo actualmente de forma rutinaria en la mayoría de nuevos antimicrobianos y su trascendencia parece haber disminuido. También hay que destacar el elevado número de trabajos en los que se comparan las distintas técnicas o modelos (sobre todo *in vitro*) que se utilizan en este tipo de ensayos<sup>27</sup>.

Teniendo en cuenta todos ellos, se han establecido "patrones" de comportamiento de las combinaciones antimicrobiano-microorganismo en relación con estos parámetros. De nuestra experiencia, al igual que de la de otros muchos investigadores, se ha establecido que existen ciertos grupos de antimicrobianos que carecen de EPA o éste es poco significativo (betalactámicos con grampositivos), mientras que otras clases como los macrólidos, aminoglucósidos o quinolonas poseen unos valores altos frente a la mayoría de los microorganismos ensayados, tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>14,25,26</sup>.

El mismo comportamiento se puede seguir en la valoración de parámetros como el efecto de las sub-CMI sobre el crecimiento o la morfología bacteriana. Parece existir una relación entre la duración del EPA y la de los efectos de las concentraciones sub-CMI; antimicrobianos como los macrólidos o quinolonas parecen impedir el crecimiento de las bacterias hasta en 24 h, mientras que en betalactámicos este efecto (aunque también significativo), es más reducido<sup>19</sup>. Por contra, los efectos de estos últimos sobre la morfología bacteriana son más variados, tal vez a causa del mecanismo de acción, más relacionado con la forma de las células que en los macrólidos o quinolonas. En cuanto a la inmunomodulación, se ha observado que tanto los betalactámicos (amoxicilina, cefotaxima, etc.) como las fluorquinolonas y los macrólidos parecen inducir un incremento de las funciones de PMN (actividad bactericida o fagocitosis)<sup>9,28</sup>.

## Conclusiones

Como conclusiones destaca que la utilidad de los modelos *in vitro* e *in vivo* en el estudio de la farmacodinamia ha llevado en las últimas décadas a la obtención de un altísimo número de resultados que engloban a la práctica totalidad de

los antimicrobianos de interés general. Si bien algunas técnicas y modelos necesitarían un mayor consenso para su estandarización, la realidad es que todos los resultados que se obtengan tendrán, sin duda, un gran valor en el estudio de la farmacodinamia de los antimicrobianos. Desde los estudios *in vitro*, necesarios para tener un estimación del comportamiento de un compuesto, hasta los modelos *in vivo* que ofrecen un dato más aproximado de lo que puede ocurrir en la clínica humana, todos han demostrado presentar, en general, una adecuada correlación con los datos obtenidos de ensayos clínicos y de la experiencia clínica.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Zak O, O'Reilly T. Animal models in the evaluation of antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1.527-1.531.
2. Aguilar L, Giménez MJ, Dal-Ré R. Una aproximación explicativa de la eficacia terapéutica de las penicilinas frente a *Streptococcus pneumoniae*. *Rev Esp Quimioterap* 1996; 9: 260-265.
3. Martín M, Gómez-Lus ML, Aguilar L, Martínez P, Giménez MJ, Prieto J. Effect of clavulanic acid and/or polymorphonuclear neutrophils on amoxicillin bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 512-516.
4. Thorburn CE, Knott S, Edwards DI. *In vitro* activities of oral  $\beta$ -lactams at concentrations achieved in humans against penicillin-susceptible and -resistant pneumococci and potential to select resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1.973-1.979.
5. Balcabao IP, Aguilar L, Martín M, García Y, Dal-Ré R, Prieto J. Activities against *Streptococcus pneumoniae* of amoxicillin and cefotaxime at physiological concentrations: *in vitro* pharmacodynamic simulation. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2.904-2.906.
6. Fenoll A, Jado I, Casal J, Giménez MJ, Aguilar L. Comparative *in vitro* pharmacodynamic simulation with amoxicillin and cefotaxime physiological concentrations against 10 penicillin-resistant (PRP) and 10 penicillin-susceptible (PSP) *Streptococcus pneumoniae* strains [resumen M-297]. Hamburgo: Program and Abstracts of the 2<sup>nd</sup> European Congress of Chemotherapy, 1998.
7. Pérez-Trallero E, Alkorta M, García-Arenzana JM, Iturzaeta A, Gomariz M. *In vitro*, *in vivo* and *ex vivo* studies with oral  $\beta$ -lactams against *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41: 629-634.
8. Pérez-Trallero E, Alkorta M, Montes M, Gutiérrez C, García-Arenzana JM. *Ex vivo* study of serum bactericidal titers of oral cephalosporins compared with those of amoxicillin against *Streptococcus pneumoniae* sensitive and resistant to penicillin [resumen C17]. Washington DC: Program and Abstracts

- of the 35<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, 1995; 42.
9. Gómez-Lus ML, Giménez MJ, Prieto J, Martín M, Frías J, Aguilar L. Effect of polymorphonuclear neutrophils on serum bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae* after amoxicillin administration. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998; 17: 40-43.
  10. Pérez-Trallero E, Alkorta M, Gil A, Vicente D, Part C. Comparison of activity of amoxicillin with that of oral cephalosporins against *Streptococcus pneumoniae* using a mouse protection model [resumen C16]. p. 42. Washington DC: Program and Abstracts of the 35<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, 1995; 42.
  11. Soriano F, Ponte C, Nieto E, Parra A. Correlation of *in vitro* activity and pharmacokinetic parameters with *in vivo* effect of amoxicillin, co-amoxiclav and cefotaxime in a murine model of pneumococcal pneumonia. J Antimicrob Chemother 1996; 38: 227-236.
  12. Vogelman B, Gudmundsson S, Turnidge J. *In vivo* postantibiotic effect in a thigh infection in neutropenic mice. J Infect Dis 1988; 157: 287-298.
  13. Vogelman B, Gudmundsson S, Leggett J, Turnidge J. Correlation of antimicrobial pharmacokinetic parameters with therapeutic efficacy in an animal model. J Infect Dis 1988; 158: 831-847.
  14. Craig WA, Gudmundsson S. The postantibiotic effect. En: Lorian V, editor. Antibiotics in laboratory medicine (4<sup>a</sup> ed.). Baltimore: Williams and Wilkins, 1996; 296-329.
  15. Sande WA, Korzeniowski OM, Allegro GM, Brennan RO, Zak O, Scheld WM. Intermittent or continuous therapy of experimental meningitis due to *S. pneumoniae* in rabbits: preliminary observations on the postantibiotic effect in vivo. Rev Infec Dis 1981; 3: 98-109.
  16. Hessen MT, Pitsakis PG, Levison ME. Absence of a postantibiotic effect in experimental left-sided *Streptococcus faecalis* endocarditis treated with penicillin plus gentamicin. En: Gillissen G, Opferkuch W, Peters G, Pulverer G, editores. The influence of antibiotics on the host-parasite III. Berlín-Heidelberg: Springer-Verlag, 1989; 222-225.
  17. Cars O, Ogren S. A microtechnique for the determination of antibiotics in muscle. J Antimicrob Chemother 1981; 8: 39-48.
  18. Renneberg J, Walder M. A mouse model for simultaneous pharmacokinetics and efficacy studies of antibiotics at sites of infection. J Antimicrob Chemother 1988; 22: 51-60.
  19. Odenholt-Tornqvist I. Studies of the postantibiotic effect and the postantibiotic sub-MIC effect of meropenem. J Antimicrob Chemother 1993; 31: 881-892.
  20. Lorian V, Gemmell CG. Effect of low antibiotic concentrations on bacteria: effects on ultrastructure, virulence, and susceptibility to immunodefenses. En: Lorian V editor. Antibiotics in laboratory medicine (4<sup>a</sup> ed.). Baltimore: Williams and Wilkins, 1996; 397-452.
  21. Fuentes F, Anta L, Izquierdo J, Gómez-Lus ML, Prieto J. Comparación del efecto *in vitro* e *in vivo* de meropenem y ciprofloxacino sobre la morfología de *E. coli* y *S. aureus*. Rev Esp Quimioterap 1998; 11: 238-244.
  22. Zhanel GG, Kim SO, Davidson RJ, Hoban DJ, Nicolelle LE. Effect of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin and gentamicin on the adherence of *P. aeruginosa* to Vero cells and voided uroepithelial cells. Chemotherapy 1993; 39: 105-111.
  23. Hirahata Y, Kaku M, Mizukane R, Ishida K, Nobuhiko N, Matsumoto T et al. Potential effects of erythromycin on host defense systems and virulence of *P. aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36: 1.922-1.927.
  24. Oshida T, Onta T, Nakanishi N, Matsushita T, Yamaguchi T. Activity of sub-minimal inhibitory concentrations of aspoxicillin in prolonging the postantibiotic effect against *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 1990; 26: 29-38.
  25. Fuentes F, Izquierdo J, Martín M, Gómez-Lus ML, Prieto J. Postantibiotic and sub-MIC effects of azithromycin and isepamicin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 414-418.
  26. Fuentes F, Martín MM, Izquierdo J, Gomez-Lus ML, Prieto J. *In vivo* and *in vitro* study of several pharmacodynamic effects of meropenem. Scand J Infect Dis 1995; 27: 469-474.
  27. MacKenzie FM, Gould IM. The postantibiotic effect. J Antimicrob Chemother 1993; 32: 519-537.
  28. Cándido A. Antibióticos y mecanismos de defensa. En: Eficacia *in vivo*. Eficacia *in vitro*. Madrid: Ediciones Doyma S.A., 1997; 51-60.

## DISCUSIÓN

J. PASCUAL: Una de las limitaciones de los estudios *in vitro* es que la mayoría de los métodos que se han explicado se hacen en un medio acelular, es decir, se hacen con un medio de cultivo artificial y obviamente la situación *in vivo* es muy distinta. Me gustaría reclamar la importancia que en nuestra opinión tiene un parámetro farmacológico que sería estudiar la concentración intracelular de los antibióticos y su correlación

con la actividad intracelular. Es decir, creo que es un parámetro importante no sólo en aquellos casos en los que hablamos de microorganismos que sean patógenos intracelulares estrictos sino que la mayoría de las bacterias en un momento determinado de la patogenia de la enfermedad van a tener un comportamiento intracelular o van a tener una multiplicación intracelular. En ese sentido, creo que es un parámetro que, con

vistas a modelos experimentales, puede aportar una información importante.

F. FUENTES: Los parámetros farmacodinámicos están bastante relacionados con la farmacocinética. En todos los modelos que he revisado, tal vez un poco rápido, la farmacocinética debe estar bastante controlada. Es importante saber

los valores que se van a alcanzar para posteriormente poder compararlos con otros resultados de efectos postantibióticos en otros modelos, incluso en el mismo con otras concentraciones más altas. Hay una relación importante entre los modelos de farmacocinética y farmacodinámica.

---

# El modelo de farmacocinética humanizada en los modelos animales de infección

---

Joan Gavalda\* y Albert Pahissa

Servei de Malalties Infeccioses. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona.

## RESUMEN

La eficacia *in vivo* de un antimicrobiano se ve afectada por su farmacocinética y farmacodinamia. Probablemente la mayor limitación de los estudios de eficacia terapéutica que utilizan modelos animales de infección la podemos hallar en las diferencias entre la farmacocinética de los animales y la de los humanos. Dado que la farmacocinética de los antibióticos influye en la respuesta *in vivo* de los antimicrobianos deberían tenerse en cuenta las variaciones de la farmacocinética interespecies. Los fármacos pueden ser administrados a los animales a dosis que hagan alcanzar concentraciones séricas similares a las humanas, pero de forma invariable, son eliminados más rápidamente en los animales que en los humanos. Este problema puede solucionarse de dos formas: manteniendo constante la relación entre la vida media del antibiótico y su intervalo de dosificación, de manera que la administración del antibiótico se realice cada cuatro vidas medias o simulando el perfil farmacocinético humano en los animales, lo que se ha denominado farmacocinética humanizada. La adaptación a la farmacocinética humana puede conseguirse mediante diferentes técnicas como son la dosificación repetida fraccionada, la disminución de la eliminación del fármaco mediante la alteración de su eliminación biliar o renal o la infusión continua del antibiótico para simular la farmacocinética humana en el animal. Sin embargo, estas técnicas están limitadas porque se presupone el conocimiento de los perfiles farmacocinéticos en humanos y esta información se obtiene en una fase tardía del desarrollo de los nuevos compuestos. Por tanto, sólo pueden utilizarse cuando se conoce la farmacocinética en humanos de un antibiótico.

### Palabras clave:

Farmacocinética humanizada. Farmacocinética animal. Farmacocinética humana.

## HUMAN-LIKE PHARMACOKINETIC MODEL IN ANIMAL INFECTION MODELS

Although the *in vitro* potency of an antimicrobial remains a critical predictor, the pharmacokinetics and pharmacodynamics of any particular agent can dramatically affect the *in vivo* efficacy. Perhaps the greatest limitation in the use of animal models for studying chemotherapy, and perhaps the single most-ignored parameter, involves differences in the pharmacokinetic parameters of antibiotics between humans and animals. The predominate differences lie in the faster elimination of drugs in small animals, compared to humans. Although the dosage of antimicrobial agent administered can often be adjusted to mimic the peak serum levels found in humans, compensating for the faster elimination of most drugs is indeed more difficult.

Consideration of these pharmacokinetic differences has led some researchers to adapt antimicrobial dosing to override faster elimination of compounds by animals in order to obtain pharmacokinetics more similar to those expressed by humans. Repeated fractional dosing, renal impairment, and continuous infusion have all been used to mimic human pharmacokinetics of antimicrobial agents in small animals.

### Key words:

Human-like pharmacokinetic. Animal pharmacokinetics. Human pharmacokinetic.

---

\*Correo electrónico: gavalda@hg.vhebron.es.

## Introducción

Los modelos discriminativos están ideados para que se asemejen al máximo a la infección que se produce en humanos (p. ej., endocarditis y osteomielitis en conejos y ratas o meningitis en conejos). Estos modelos poseen una serie de ventajas prácticas y científicas sobre los estudios clínicos que los hacen altamente recomendables en la evaluación de nuevas pautas terapéuticas. Variables como el estadio de la enfermedad, la gravedad de las complicaciones, la heterogeneidad de la población y la farmacocinética, que son complejas y que podrían confundir los resultados de los estudios clínicos por su gran variabilidad, pueden mantenerse de manera constante e inalterable en los estudios en el modelo animal. Así mismo, los parámetros que ofrecerán los resultados son muy concretos y, por tanto, estadísticamente fáciles de comparar (p. ej., número de microorganismos en el tejido infectado). A su vez, los resultados son reproducibles, lo que les otorga una mayor validez. Finalmente, es posible utilizar el número de animales necesario para responder a las cuestiones planteadas, lo que resulta imposible de realizar en estudios clínicos de enfermedades tan poco frecuentes como la endocarditis o la meningitis. Con la utilización de este tipo de modelos se han contestado preguntas, por otra parte, difíciles o imposibles de comprobar en clínica, como la importancia del efecto antibiótico bactericida en comparación con el bacteriostático, o cuál es la dosis mínima eficaz o el intervalo de dosificación más favorable de un antibiótico, entre otras.

A pesar de todas estas ventajas, la extrapolación de los resultados a los humanos debe hacerse con una gran cautela. Para evitar al máximo los errores hay que tener en cuenta las siguientes consideraciones:

1. La infección ha de simular al máximo lo que ocurre en humanos, fundamentalmente en cuanto al inóculo que la induce, a la respuesta del huésped a la misma y a su evolución.

2. En estudios de eficacia terapéutica, debe existir una comparación con las pautas de tratamiento consideradas como de elección con eficacia clínica demostrada.

3. Dado que la farmacocinética de los antibióticos influye en la respuesta *in vivo* de los antimicrobianos deberían tenerse en cuenta las variaciones de la farmacocinética interespecies. Los fármacos pueden ser administrados a los animales a dosis que hagan alcanzar concentraciones séricas similares a las humanas, pero in-

variabilmente, son eliminados de forma más rápida en los animales que en los humanos. Este problema puede solucionarse de dos formas: manteniendo constante la relación entre la vida media del antibiótico y su intervalo de dosificación, de manera que la administración del antibiótico se realice cada cuatro vidas medias o simulando el perfil farmacocinético humano en los animales, lo que se denomina farmacocinética humanizada.

Para destacar la importancia que puede tener la "humanización" de la farmacocinética en los animales puede ponerse como ejemplo la endocarditis. La endocarditis infecciosa es una infección difícil de curar. Aunque muchos de los microorganismos que la producen son susceptibles a un buen número de antimicrobianos, el tratamiento debe prolongarse varias semanas para conseguir curar al paciente. Hay diferentes razones que se han esgrimido para explicar la dificultad en esterilizar las vegetaciones: *a)* la baja penetración de los antibióticos en las vegetaciones; *b)* el estado metabólico alterado de los microorganismos que se encuentran en el interior de la vegetación, y *c)* la ausencia de mecanismos de defensa del huésped en el seno de la vegetación. Estos factores, considerados desde hace tiempo como clásicos, se han visto complementados por otros dos que son la farmacocinética de penetración de los antimicrobianos en el interior de la vegetación y la farmacodinamia específica de esta infección. El grupo de Claude Carbon demostró tres patrones diferentes de difusión en el interior de la vegetación, después de estudiar la farmacocinética de penetración de 10 antimicrobianos mediante autorradiografía de las vegetaciones<sup>1,2</sup>: *a)* el primero es el hallado para teicoplanina <sup>14</sup>C en el que el antibiótico está concentrado en la periferia de la vegetación sin penetrar en su seno; *b)* el segundo es el que presenta la ceftriaxona <sup>14</sup>C y, en menor medida, la penicilina <sup>14</sup>C, que se difunden progresivamente hacia el interior de la vegetación, aunque persiste un gradiente muy elevado de concentraciones entre la periferia y el seno de la vegetación, y *c)* el tercer patrón presenta una distribución homogénea del antibiótico marcado en la totalidad de la lesión. Este patrón fue observado para tobramicina, pefloxacin, temofloxacin, esparfloxacin y daptomicina.

Por otra parte, trabajos que han utilizado el modelo de endocarditis experimental han demostrado una serie de factores farmacodinámicos, relacionados con la dosificación de los antimicrobianos, específicos para la endocarditis. Así, diversos estudios en el modelo de endocar-

ditis, a diferencia de lo que sucede en el modelo de infección subcutánea y en el de neumonitis<sup>3</sup>, han demostrado que el mantenimiento de una concentración de betalactámicos por encima de la concentración mínima inhibitoria (CMI) no fue suficiente para asegurar la esterilización de las vegetaciones<sup>4</sup>. A su vez, estos estudios demuestran que una vez obtenida una concentración adecuada de antibióticos, el parámetro de eficacia más importante es la duración del tiempo de contacto entre los antimicrobianos y la bacteria y no la concentración del betalactámico por sí misma. También para otros antimicrobianos no betalactámicos, su farmacocinética, su farmacodinamia y el patrón de difusión en el interior de la vegetación pueden ser factores muy importantes para determinar su dosificación en el tratamiento de la endocarditis. Así, para los glucopéptidos el porcentaje de letalidad bacteriana no es dependiente de su concentración pico sérica, sino del tiempo en el que existen concentraciones plasmáticas inhibitorias del crecimiento bacteriano<sup>5</sup>. En el caso de los aminoglucósidos, estudios recientes han demostrado la posibilidad de su administración una vez al día frente a su administración fraccionada debido a unas características farmacodinámicas muy concretas<sup>6-11</sup>.

Por lo anteriormente reseñado, parece recomendable que para poder extrapolar a humanos los resultados de los estudios de eficacia terapéutica en el modelo de endocarditis experimental, la farmacocinética de los antibióticos analizados debe ser lo más parecida a su farmacocinética en humanos (farmacocinética humanizada).

Diferentes autores han empezado a utilizar el modelo de farmacocinética humanizada de los antimicrobianos en sus estudios terapéuticos realizados en diversos modelos animales<sup>12-31</sup>. De la revisión de estos trabajos se deducen una serie de consideraciones: *a)* preguntas que se habían planteado sobre eficacia terapéutica, cuya respuesta todavía no estaba totalmente contestada en trabajos previos, han podido ser definitivamente respondidas al utilizar la farmacocinética humanizada, y *b)* la utilización de farmacocinética no humanizada puede inducir errores tanto de infra como de supervaloración de la eficacia de determinados antimicrobianos. Este hecho haría casi imprescindible el uso de la farmacocinética humanizada en estudios de eficacia terapéutica que compararan antimicrobianos de diferentes categorías (p. ej., betalactámicos frente a glucopéptidos).

La adaptación a la farmacocinética humana puede conseguirse mediante diferentes técnicas

como la dosificación repetida fraccionada, la disminución de la eliminación del fármaco mediante la alteración de su eliminación biliar o renal, o la infusión continua del antibiótico para simular la farmacocinética humana en el animal. Sin embargo, estas técnicas están limitadas porque se presupone el conocimiento de los perfiles farmacocinéticos en humanos y esta información se obtiene en una fase tardía en el desarrollo de nuevos compuestos. Por tanto, sólo pueden utilizarse cuando se conoce la farmacocinética en humanos de un antibiótico.

### **Dosis repetida fraccionada**

Se puede simular la farmacocinética humana en suero repetida de dosis decrecientes del fármaco, con lo que la eliminación más rápida del fármaco en el animal se contrarrestará con inyecciones repetidas de más compuesto. Esta técnica ha sido utilizada por Gerber et al<sup>13-16,26,28,29</sup> en modelos de infección en muslo de ratón por *Pseudomonas aeruginosa* para conocer los parámetros farmacocinéticos relacionados con la eficacia terapéutica de diferentes clases de antibióticos. La conclusión que se extrae de los modelos de Gerber, y que probablemente puede generalizarse, es que la utilización de farmacocinética no humanizada puede inducir errores tanto de infra como de supervaloración de la eficacia de determinados antimicrobianos. Esta técnica también ha sido utilizada por Hatano et al<sup>32</sup>, quienes consiguieron simular en ratones el perfil farmacocinético humano de diferentes cefalosporinas. Estos autores desarrollaron una fórmula matemática para predecir las dosis necesarias que deben administrarse a los animales, mediante la administración fraccionada del fármaco para simular la farmacocinética humana. Mediante esta fórmula estos autores fueron capaces de obtener los perfiles farmacocinéticos humanizados en ratones para cefpiroma, flomoxef y cef-tacídima.

### **Disminución de la eliminación biliar**

El 40 % de la eliminación de ceftriaxona en humanos se produce por vía biliar. La administración de diclofenaco junto con ceftriaxona en conejos demostró que las concentraciones séricas y los valores del área bajo la curva (ABC) de ceftriaxona fueron similares a los que se encuentran en humanos a las dosis utilizadas habitualmente. Estas alteraciones en la farmacocinética producidas por el diclofenaco vinieron determinadas por la disminución de su eliminación biliar.

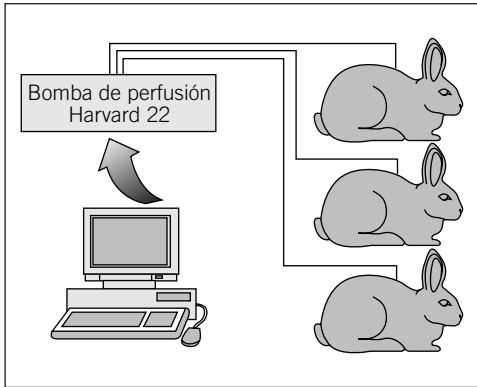


Fig. 1. Esquema de la farmacocinética humanizada.

### Disminución de la eliminación renal

La alteración de la función renal mediante diferentes nefrotóxicos induce a una eliminación más lenta de los antimicrobianos y, con ello, su farmacocinética de eliminación es más similar a la de los humanos. En ratones, esto se consigue mediante la inyección subcutánea de 10 mg/kg de nitrato de uranilo. Esta técnica fue utilizada por Craig et al<sup>33</sup> para evaluar la eficacia de la administración en una sola dosis diaria de amikacina frente a su administración fraccionada en modelos de infección de muslo y neumonía en ratones netropénicos. Con esta técnica, estos autores pudieron simular la farmacocinética humana de una sola dosis diaria de amikacina y demostrar que su eficacia era similar a la administración fraccionada.

### Administración intravenosa continua para alcanzar el estado de equilibrio

Para contrarrestar la administración más rápida de los antimicrobianos animales se ha utilizado la administración continua intravenosa hasta alcanzar la fase de *steady state*. Esto se ha realizado mediante infusión intravenosa utilizando bombas de infusión o bombas osmóticas que liberan de forma mantenida fármaco intravascularmente. Estos modelos no simulan el perfil farmacocinético humano de dosificación fraccionada, por lo que la extrapolación de resultados resulta limitada, ya que en humanos no es frecuente la utilización de infusión continua de antibióticos. Con esta técnica pueden compararse tratamientos mediante administración fraccionada frente a infusión continua, pero los resultados de la administración fraccionada del fá-

maco tendrán las limitaciones propias de la utilización de la farmacocinética del animal.

La técnica de farmacocinética humanizada se basa en la administración de dosis decrecientes de antibiótico al animal por vía intravenosa mediante una bomba de infusión intravenosa controlada por ordenador que permite simular en el animal el perfil farmacocinético humano del antibiótico (fig. 1).

El esquema de trabajo de los estudios de farmacocinética humanizada en los animales se divide en tres partes:

1. *Estudio de la farmacocinética de los distintos antimicrobianos en el animal.* Determinación de las concentraciones séricas tras la administración intravenosa, en bolo, de cada uno de los antimicrobianos en el conejo. A partir de las concentraciones séricas se determinarán el perfil farmacocinético, las constantes de eliminación y distribución (ésta en el modelo bicompartimental), y el volumen de distribución. Estos valores son imprescindibles para aplicar el modelo matemático de humanización de la farmacocinética en animales.

2. *Aplicación de un modelo matemático.* Este modelo permitirá conocer las dosis que deben irse administrando en cada período de tiempo al animal para pasar de un perfil farmacocinético animal a uno humanizado.

3. *Estudio de la farmacocinética humanizada en los animales.* Práctica del ensayo de farmacocinética humanizada de los distintos antimicrobianos en el animal. Esto se realiza mediante la determinación de las concentraciones séricas de antibiótico tras la administración intravenosa, mediante una bomba de infusión controlada por ordenador, de las dosis halladas tras la aplicación del modelo matemático. Este sistema de infusión permite administrar volúmenes distintos a diferentes intervalos de tiempo. Así, por ejemplo, una secuencia que se podría realizar sería: 2.000  $\mu\text{l/h}$  durante 6 min, después 1.500  $\mu\text{l/h}$  durante 3 min, etc., y así sucesivamente. También permite repetir esta secuencia tantas veces como deseemos. Por tanto, si se considera una secuencia como la administración de una dosis de un antimicrobiano en humanos, puede administrarse al animal un tratamiento que simule al máximo la administración del fármaco al hombre (p. ej., 2 g /4 h de ampicilina intravenosa).

### Estudio de la farmacocinética de los distintos antimicrobianos en el animal

Este estudio se realiza en grupos de entre 5 y 10 conejos sanos para cada uno de los antimicro-

crobianos. Los antibióticos, las dosis y los tiempos de extracción de las muestras son arbitrarios. De todas formas, por lo general se puede tomar como norma que los tiempos de extracción (en minutos después de la inyección) podrían ser de 5, 15, 30, 40, 50, 60, 90, 120 y 180 para los antimicrobianos que siguen un modelo monocompartimental y de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300, 360 y 480 para aquellos con un modelo bicompartimental.

La extracción de sangre puede realizarse por punción de la vena marginal de la oreja, aunque es recomendable realizarla a través de un catéter colocado en la arteria carótida o la vena yugular común. Los tiempos finales de extracción pueden variar dependiendo de los resultados de los primeros ensayos.

La determinación de las constantes farmacocinéticas necesarias será diferente dependiendo de si los antibióticos siguen un modelo de cinética de primer orden monocompartimental abierto o bicompartimental.

En el modelo monocompartimental, una vez conocidas las concentraciones séricas en el animal, se realizará la gráfica de la concentración en suero-tiempo y, posteriormente, utilizando el método de los mínimos cuadrados se obtendrán la constante de eliminación del fármaco ( $ke/l$ ) y la concentración plasmática a tiempo 0 ( $C_0$ ) mediante la relación lineal existente entre el logaritmo neperiano de la concentración sérica en el eje de ordenadas y el tiempo de extracción en el de abscisas:

$$y = A - b x$$

siendo  $C_0 = e^A$  y  $ke/l = b$

En este caso, la relación lineal tendrá la siguiente forma:

$$\text{Ln } C_p = \text{Ln } C_0 - ke/l \times t,$$

donde  $C_p$  = concentración plasmática en el tiempo ( $t$ ).

El volumen de distribución ( $V_d$ ) se obtiene a partir de:

$$V_d = D/C_0$$

donde  $D$  = dosis administrada en mg/kg.

En el modelo de cinética de primer orden bicompartimental abierto la eliminación de los fármacos depende, al igual que en el monocompartimental, de la distribución y de la eliminación,

pero adquiriendo en este caso una especial relevancia el proceso de distribución, hecho que no sucedía en el modelo monocompartimental. En el modelo de primer orden bicompartimental pueden diferenciarse dos fases:

1. Una primera fase o rápida, determinada por la constante de disposición  $\alpha$ , en la que el fármaco desaparece del compartimento endovascular, en gran parte, por paso al compartimiento periférico (tejidos) (aunque simultáneamente se estén produciendo un cierto grado de eliminación y un cierto grado de retorno de los tejidos a la sangre).

2. Una segunda fase o lenta, determinada por la constante de disposición  $\beta$ , en la que ya se ha alcanzado un equilibrio entre el compartimiento central y periférico; en esta fase las concentraciones plasmáticas disminuyen principalmente por la eliminación desde el compartimiento central.

El curso temporal de las concentraciones plasmáticas depende de la suma de los procesos exponenciales, el  $\alpha$  y el  $\beta$ :

$$C_p = A_0 \times e^{-\alpha \times t} + B_0 \times e^{-\beta \times t}$$

donde  $A_0$  = concentración plasmática para  $t = 0$  en la fase de distribución.

$B_0$  = concentración plasmática para  $t = 0$  en la fase de eliminación.

Tras la administración de una dosis del fármaco a 5 animales, realizamos extracciones de sangre a diferentes tiempos, y determinamos las diferentes concentraciones séricas. Calculamos la media a partir de los valores de los 5 animales, y realizamos gráficas a partir de los puntos obtenidos (curva de concentraciones plasmáticas-tiempo). Según estas gráficas, consideramos a partir de qué momento se inicia la fase de eliminación. Las concentraciones obtenidas en los tiempos posteriores nos permitirán obtener mediante el método de los mínimos cuadrados los valores de  $B_0$  y  $\beta$  mediante la relación lineal existente entre el logaritmo neperiano de la concentración sérica en el eje de ordenadas y el tiempo de extracción en el de abscisas:

$$y = A - b x$$

siendo  $B_0 = e^A$  y  $ke/l = \beta$ .

En este caso, la relación lineal tiene la siguiente fórmula:

$$\text{Ln } C_p = \text{Ln } B_0 - \beta \times t$$



donde Cp = concentración plasmática en el tiempo (t).

Posteriormente mediante la suma de residuales, se ajustan las concentraciones de la fase de distribución a los valores de B<sub>0</sub> y β obtenidos previamente y después, también por el método de los mínimos cuadrados, se obtienen los valores de A<sub>0</sub> y α. A partir de estos resultados podemos calcular: Vc = volumen de distribución del compartimento central; k<sub>21</sub> = constante de distribución del compartimento periférico al central; k<sub>13</sub> = constante de eliminación, y C<sub>0</sub> = concentración plasmática teórica a tiempo 0:

$$C_0 = A_0 + B_0$$

$$Vc = D/C_0 \text{ (D = dosis (mg/kg))}$$

$$VdA = (\alpha/k_{21}) \times Vc \text{ (volumen distribución área)}$$

$$k_{21} = (A \times \beta + B \times \alpha)/C_0$$

$$k_{13} = \alpha \times \beta/k_{21} = kel$$

**Aplicación de un modelo matemático**

Administración intravenosa en infusión corta según el modelo de cinética de primer orden monocompartimental abierto. La cinética de eliminación en los fármacos que poseen una cinética de primer orden monocompartimental abierto se rige por la siguiente relación matemática:

$$Cp = C_0 \times e^{-kel \times t}$$

donde Cp = concentración plasmática del fármaco en µg/ml.  
 C<sub>0</sub> = concentración plasmática a tiempo 0.  
 kel = constante de eliminación.  
 t = tiempo en horas.

Entendemos, pues, que la única diferencia entre la cinética humana y la del conejo estriba en el valor de la kel, que es superior en el roedor (kelh < kelc) o, en otras palabras, que el tiempo de vida media del fármaco en humanos (kel = 0,693/t<sub>1/2</sub>) es más elevado que el del roedor:

kelh = constante de eliminación en el hombre.  
 kelc = constante de eliminación en el conejo.

El sistema que utilizamos para humanizar la cinética de eliminación en el conejo se basa en la necesidad de proporcionar a este animal cantidades de fármaco decrecientes que contrarresten esta velocidad de eliminación elevada:

1. Determinamos unos intervalos de tiempo (Tx) durante los que administraremos la canti-

dad de fármaco necesaria para pasar de la concentración sérica en el animal a la deseada humana.

2. En el límite final de estos intervalos (Tx), la concentración plasmática del fármaco será más elevada en la cinética humana que en la del conejo (puesto que kelc > kelh). Determinamos la concentración que hemos de conseguir (Cy) para contrarrestar esta diferencia. La concentración deseada (Cy) se obtendrá restando la concentración que deseamos alcanzar (Chx = concentración humana) de la concentración existente en el animal (Ccx), mediante la siguiente proporción, donde x = número del intervalo:

$$Cy = Chx - Ccx$$

donde

$$\text{para } x = 1 \quad Ch_1 = C_0 \times e^{-kelh \times t_1} \text{ y } Cc1 = C_0 \times e^{-kelc \times t_1}$$

$$\text{para } x = 2 \quad Ch_2 = C_0 \times e^{-kelh \times t_2} \text{ y } Cc2 = Ch_1 \times e^{-kelc \times t_2}$$

siendo

t = duración del tiempo en horas desde t = 0 hasta el final del intervalo Tx T = duración del tiempo en horas del intervalo Tx.

Así pues, la fórmula general sería, para x = 1, 2, 3..., ∞

$$Ch_x = C_0 \times e^{-kelh \times tx}$$

$$Ccx = Ch_{x-1} \times e^{-kelc \times Tx}$$

3. La cantidad de fármaco que hemos de administrar mediante infusión intravenosa continua, durante el intervalo de tiempo Tx, para conseguir la concentración deseada (Cy) (en mg/h) viene determinada por la siguiente relación:

$$Q_x = (C_y \times Vdc \times kelc \times P)/(1 - e^{-kelc \times Tx})$$

donde

Q<sub>x</sub> = dosis de antibiótico a administrar durante Tx (mg/h).  
 Vdc = volumen de distribución del fármaco en el conejo (l/kg).  
 T<sub>x</sub> = intervalo de tiempo (h).  
 P = peso del animal (kg).

Obviamente, la primera dosis a administrar estará destinada a obtener C<sub>0</sub> y vendrá determinada por:

$$Q_x = (C_0 \times Vdc \times kelc \times P)/(1 - e^{-kelc \times Tx})$$

4. Puesto que realizaremos una infusión continua, la velocidad de infusión a la que hemos de programar la bomba de infusión ( $V_x$ , en ml/h) dependerá de la concentración de la disolución de antibiótico que administremos ( $S$ , en mg/ml):

$$\text{si } V_x = Q_x/S$$

Así pues, el volumen al cual programaremos la bomba de infusión que administrará la cantidad necesaria de antibiótico durante cada uno de los intervalos de tiempo, para conseguir la concentración deseada que contrarrestará la eliminación superior del conejo respecto a la humana, con el objeto de imitar la cinética de eliminación humana en los fármacos con modelo de distribución monocompartimental es el siguiente:

$$V_x = ([C_0 \times e^{-k_{el}h \times tx}] - [Ch_{x-1} \times e^{-k_{el} \times Tx}] \times Vdc \times k_{el} \times P / [1 - e^{-k_{el} \times Tx}] \times S)$$

Administración intravenosa en infusión continua según el modelo de cinética de primer orden monocompartimental abierto

### 1. Fase de infusión inicial

La cantidad de fármaco que debe administrarse mediante infusión intravenosa continua ( $Q_x$ , mg/h) para conseguir la concentración deseada ( $C_y$ ) viene determinada por la siguiente relación:

$$Q_x = (C_y \times Vdc \times k_{el} \times P) / (1 - e^{-k_{el} \times tx})$$

donde

$Q_x$  = dosis de antibiótico a administrar durante tx (mg/h).

$Vdc$  = volumen de distribución del fármaco en el conejo (l/kg).

$T_x$  = intervalo de tiempo (h).

$P$  = peso del animal (kg).

$C_y$  = concentración deseada a conseguir ( $\mu\text{g/ml}$ )

La velocidad de infusión a la que hemos de programar la bomba de infusión ( $V_x$ , en ml/h) dependerá de la concentración de la disolución de antibiótico que administremos ( $S$ , en mg/ml):

$$V_x = Q_x/S$$

### 2. Fase de mantenimiento

La cantidad de fármaco que debe administrarse mediante infusión intravenosa continua ( $Q_x$ , mg/h) para mantener la concentración de-

seada ( $C_y$ ) viene determinada por la siguiente relación:

$$Q_x = C_y \times Vdc \times k_{el} \times P$$

donde

$Q_x$  = dosis de antibiótico a administrar durante tx (mg/h).

$Vdc$  = volumen de distribución del fármaco en el conejo (l/kg).

$T_x$  = intervalo de tiempo (h).

$P$  = peso del animal (kg).

$C_y$  = concentración deseada a mantener ( $\mu\text{g/ml}$ ).

Como anteriormente, la velocidad de infusión a la que hemos de programar la bomba de infusión ( $V_x$ , en ml/h) dependerá de la concentración de la disolución de antibiótico que administremos ( $S$ , en mg/ml):

$$V_x = Q_x/S$$

Administración intravenosa en infusión corta según el modelo de cinética de primer orden bi-compartimental abierto. La cinética de los fármacos que siguen un modelo de primer orden bi-compartimental abierto se rige por la siguiente relación matemática:

$$Cp = A_0 \times e^{-\alpha \times t} + B_0 \times e^{-\beta \times t}$$

donde

$A_0$  = concentración plasmática para  $t = 0$  en la fase de distribución.

$B_0$  = concentración plasmática para  $t = 0$  en la fase de eliminación.

El propósito de este modelo matemático es hallar las cantidades de antibiótico que deben administrarse al animal para contrarrestar su eliminación más rápida respecto a los humanos. Este modelo queda resumido a continuación:

1. Determinar la concentración sérica humana que queremos obtener una hora después del inicio de una infusión de 0,5 h de duración ( $Ch_{1h}$ ). Una vez determinada esta concentración, obtener la concentración sérica humana al final de la infusión de 0,5 h ( $Ch_{0,5h}$ ) mediante la siguiente fórmula:

$$Ch_{0,5h} = Ah_0 \times e^{-\alpha h \times 0,5} + Bh_0 \times e^{-\beta h \times 0,5}$$

donde

$Ah_0$  y  $Bh_0$  se obtienen con el siguiente sistema de ecuaciones:

$$\left. \begin{aligned} Ch_{1h} &= Ah_0 \times e^{-\alpha h \times 1} + Bh_0 \times e^{-\beta h \times 1} \\ kh_{21} &= (Ah_0 \times \beta h + Bh_0 \times \alpha h) / (Ah_0 + Bh_0) \end{aligned} \right\}$$

siendo  $\beta h$ ,  $\alpha h$ ,  $kh_{21}$  constantes humanas conocidas.

2. Dividir el perfil farmacocinético en las dos fases características del modelo bicompartimental: en primer lugar hasta el final de la fase de distribución y, en segundo, la fase de eliminación.

### 3. Fase de distribución

1. Determinar la duración de esta fase en el conejo ( $t\alpha$ ).

2. Obtener la concentración sérica en el conejo al final de este período ( $Cc_\alpha$ ) mediante la siguiente fórmula:

$$Cc_\alpha = Ar_0 \times e^{-\alpha r \times t\alpha} + Br_0 \times e^{-\beta r \times t\alpha}$$

donde

$Ar_0$  y  $Br_0$  se obtienen con el siguiente sistema de ecuaciones:

$$\left. \begin{aligned} Cr_0 &= Ar_0 + Br_0 \\ kr_{21} &= (Ar_0 \times \beta r + Br_0 \times \alpha r) / (Ar_0 + Br_0) \end{aligned} \right\}$$

siendo

$\beta r$ ,  $\alpha r$ ,  $kr_{21}$  las constantes farmacocinéticas en el conejo previamente obtenidas y  $Cr_0$  igual a  $Ch_{0,5h}$  también obtenido previamente.

3. Obtener la concentración necesaria al final del período de distribución ( $Cx_\alpha$ ) que contrarreste la distribución más rápida del fármaco en el animal que en el humano, mediante la diferencia de la concentración sérica humana ( $Ch_\alpha$ ) de la del conejo ( $Cc_\alpha$ ) al final de este período. Así:

$$Cx_\alpha = Ch_\alpha - Cc_\alpha$$

donde

$$\left. \begin{aligned} Ch_\alpha &= Ah_0 \times e^{-\alpha h \times t\alpha} + Bh_0 \times e^{-\beta h \times t\alpha} \\ Cc_\alpha &= Ar_0 \times e^{-\alpha r \times t\alpha} + Br_0 \times e^{-\beta r \times t\alpha} \end{aligned} \right\}$$

### 4. Fase de eliminación

1. Determinamos unos intervalos de tiempo ( $Tx$ ) durante los que administraremos la cantidad

de fármaco necesaria para pasar de la concentración sérica en el animal a la deseada humana.

2. En el límite final de estos intervalos ( $Tx$ ), la concentración plasmática del fármaco será más elevada en la cinética humana que en la del conejo (puesto que  $kc > ke/h$ ). Determinamos la concentración que hemos de conseguir ( $Cx_\beta$ ) para contrarrestar esta diferencia. La concentración deseada ( $Cx_\beta$ ), se obtendrá restando la concentración que deseamos alcanzar ( $Ch\beta x =$  concentración humana) de la concentración existente en el animal ( $Cc\beta x$ ), mediante la siguiente proporción, donde  $x =$  número del intervalo:

$$Cx\beta = Ch\beta x - Cc\beta x$$

donde

$$\text{para } Tx = 1 \quad \left. \begin{aligned} Ch\beta_1 &= Ah_0 \times e^{-\alpha h \times t1} + Bh_0 \times e^{-\beta h \times t1} \\ Cc\beta_1 &= Ch_\alpha \times e^{-ke/c \times T1} \end{aligned} \right\}$$

$$\text{para } Tx = 2 \quad \left. \begin{aligned} Ch\beta_2 &= Ah_0 \times e^{-\alpha h \times t2} + Bh_0 \times e^{-\beta h \times t2} \\ Cc\beta_2 &= Ch\beta_1 \times e^{-ke/c \times T2} \end{aligned} \right\}$$

siendo

$t_x =$  duración del tiempo en horas desde  $t = 0$  hasta el final del intervalo  $T_x$ .

$T_x =$  duración del tiempo en horas del intervalo  $T_x$ .  
 $Ch_\alpha =$  concentración sérica humana al final del período de distribución.

5. La cantidad de fármaco que hemos de administrar mediante infusión intravenosa continua ( $Q_x$ , en mg/h), durante la fase de distribución ( $t\alpha$ ) y durante los intervalos de tiempo  $T_x$  de la fase de eliminación, para conseguir la concentración deseada en la fase de distribución y de eliminación ( $Cx_\alpha$  y  $Cx_\beta$ ) viene determinada por la siguiente relación:

$$\text{Fase de distribución: } Q\alpha_x = (Cx_\alpha \times Vdc \times ke/c \times P) / (1 + ([\beta c - ke/c/\alpha c - \beta c] \times e^{-\alpha c \times t\alpha}) + ([ke/c - \alpha c/\alpha c - \beta c] \times e^{-\beta c \times t\alpha}))$$

$$\text{Fase de eliminación: } Q\beta_x = (Cx_\beta \times Vdc \times ke/c \times P) / (1 + ([\beta c - ke/c/\alpha c - \beta c] \times e^{-\alpha c \times Tx}) + ([ke/c - \alpha c/\alpha c - \beta c] \times e^{-\beta c \times Tx}))$$

6. Puesto que realizaremos una infusión continua, la velocidad de infusión a la que hemos de programar la bomba de infusión ( $V_x$ , en ml/h) dependerá de la concentración de la disolución de antibiótico que administremos ( $S$ , en mg/ml):

$$V_x = Q_x/S$$

7. La primera dosis viene determinada por la última fórmula, siendo  $C_x$  la concentración humana al fin de la infusión de 0,5 h ( $Ch_{0,5h}$ ).

Administración intravenosa en infusión continua según el modelo de cinética de primer orden bicompartimental abierto

### 1. Fase de infusión inicial

La cantidad de fármaco que hemos de administrar mediante infusión endovenosa continua ( $Q_x$ , mg/h) para conseguir la concentración deseada ( $C_y$ ) viene determinada por la siguiente relación:

$$Q_x = (C_y \times Vdc \times ke/c \times P) / (1 + [\beta c - ke/c/\alpha c - \beta c] \times e^{-\alpha c \times tx}) + ([ke/c - \alpha c/\alpha c - \beta c] \times e^{-\beta c \times tx})$$

donde

$Q_x$  = dosis de antibiótico a administrar durante tx (mg/h).

Vdc = volumen de distribución del fármaco en el compartimiento central en el conejo (l/kg).

$t_x$  = intervalo de tiempo (h).

P = peso del animal (kg).

$C_y$  = concentración deseada a conseguir ( $\mu\text{g/ml}$ ).

$\alpha c$  = constante de disposición  $\alpha$  en el conejo ( $\text{h}^{-1}$ ).

$\beta c$  = constante de disposición  $\beta$  en el conejo ( $\text{h}^{-1}$ ).

$ke/c$  = constante de eliminación en el conejo;  $k_{13}$  ( $\text{h}^{-1}$ ).

La velocidad de infusión a la que hemos de programar la bomba de infusión ( $V_x$ , en ml/h) dependerá de la concentración de la disolución de antibiótico que administremos ( $S$ , en mg/ml):

$$V_x = Q_x/S$$

### 2. Fase de mantenimiento

La cantidad de fármaco que hemos de administrar mediante infusión intravenosa continua ( $Q_x$ , mg/h) para mantener la concentración deseada ( $C_y$ ) viene determinada por la siguiente relación:

$$Q_x = C_y \times VdAc \times \beta c \times P$$

VdAc = volumen de distribución área en el conejo (l/kg).

Como anteriormente, la velocidad de infusión a la que hemos de programar la bomba de infusión ( $V_x$ , en ml/h) dependerá de la concentración

de la disolución de antibiótico que administremos ( $S$ , en mg/ml):

$$V_x = Q_x/S$$

## BIBLIOGRAFÍA

1. Cremieux AC, Maziere B, Vallois JM, Ottaviani M, Azancot A, Raffoul H et al. Evaluation of antibiotic diffusion into cardiac vegetations by quantitative autoradiography. *J Infect Dis* 1989; 159: 938-944.
2. Cremieux AC, Maziere B, Vallois JM, Ottaviani M, Bouvet A, Pocardolo JJ et al. Ceftriaxone diffusion into cardiac fibrin vegetation. Qualitative and quantitative evaluation by autoradiography. *Fundam Clin Pharmacol* 1991; 5: 53-60.
3. Leggett JE, Fantin B, Ebert S, Totsuta K, Vogelmann B, Calauré W et al. Comparative antibiotic dose effect relations at several dosing intervals in murine pneumonitis and thigh infection models. *J Infect Dis* 1989; 159: 281-292.
4. Gengo FM, Mannion TW, Nightingale CH, Schenck JJ. Integration of pharmacokinetics and pharmacodynamics of methicillin in curative treatment of experimental endocarditis. *J Antimicrob Chemother* 1984; 14: 619-631.
5. Contrepois A, Joly V, Abel L et al. The pharmacokinetics and extravascular diffusion of teicoplanin in rabbits and comparative efficacy with vancomycin in an experimental endocarditis model. *J Antimicrob Chemother* 1988; 21: 621-631.
6. Saleh-Mghir A, Cremieux AC, Vallois JM, Muffat-Joly M, Devine C, Carbon C. Optimal aminoglycoside dosing regimen for penicillin-tobramycin synergism in experimental *Streptococcus adjacens* endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 2.403-2.407.
7. Gavalda J, Cardona PJ, Almirante B, Capdevila JA, Laguarda M, Pou L et al. Treatment of experimental endocarditis due to *Enterococcus faecalis* using once-daily dosing regimen of gentamicin plus simulated profiles of ampicillin in human serum. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 173-178.
8. Blatter M, Fluckiger U, Entenza J, Glauser MP, Francioli P. Simulated human serum profiles of one daily dose of ceftriaxone plus netilmicin in treatment of experimental streptococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1.971-1.976.
9. Dorsner CW, Tallan BM, Rouse MS, Steckelberg JM, Chambers HC, Wilson WR et al. Effect of gentamicin dosing interval on ceftriaxone or penicillin treatment (Rx) of *viridans* streptococcal experimental endocarditis [resumen 700]. Atlanta: Programs and Abstracts of the 30th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, American Society for Microbiology, 1990.
10. Chambers H, Kennedy S, Fournier M, Rouse MS, Wilson WR. Ceftriaxone vs penicillin alone and with gentamicin in *viridans* streptococcal aortic valve endocarditis [resumen 701]. Atlanta: Programs and Abstracts of the 30th Interscience Conference on

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy, American Society for Microbiology, 1990.
11. Gavaldà J, Pahissa A, Almirante B, Laguarda M, Crespo E, Pou L et al. Effect of gentamicin dosing interval on therapy of *viridans* streptococcal experimental endocarditis with gentamicin plus penicillin. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2.098-2.103.
  12. Fluckiger U, Moreillon P, Blaser J, Bickle M, Glauser MP, Francioli P. Simulation of amoxicillin pharmacokinetics in humans for the prevention of streptococcal endocarditis in rats. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 2.846-2.849.
  13. Fluckiger U, Segessenmann C, Gerber AU. Integration of pharmacokinetics and pharmacodynamics of imipenem in a human-adapted mouse model. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1.905-1.910.
  14. Gerber AU, Kozak S, Segessenmann C, Fluckiger U, Bangerter T, Greter U. 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* 1989; 8: 233-237.
  15. Gerber AU, Brugger HP, Feller Ch, Stritzko T, Stalder B. Antibiotic therapy of infections due to *Pseudomonas aeruginosa* in normal and granulocytopenic mice: comparison of murine and human pharmacokinetics. *J Infect Dis* 1986; 153: 90-97.
  16. Gerber AU, Stritzko T, Segessenmann Ch, Stalder B. Simulation of human pharmacokinetics profiles in mice, and impact on antimicrobial efficacy of netilmicin, ticarcillin and ceftazidime in the peritonitis-septicemia model. *Scand J Infect Dis* 1991; 74: 195-230.
  17. Legget JE, Fantin B, Ebert S, Totsuka K, Calame W, Mattie H et al. Comparative antibiotic dose-effect relations at several dosing intervals in murine pneumonitis and thigh-infection models. *J Infect Dis* 1989; 159: 281-292.
  18. Mizen L, Woodnutt G, Kernutt I, Catherall E. Simulation of human serum pharmacokinetics of ticarcillin-clavulanic acid and ceftazidime in rabbits, and efficacy against experimental *Klebsiella pneumoniae* meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 693-699.
  19. Woodnutt G, Berry V, Mizen L. Simulation of human serum pharmacokinetics of cefazolin, piperacillin, and BRL 42715 in rats and efficacy against experimental intraperitoneal infections. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1.427-1.431.
  20. Woodnutt G, Catherall EJ, Kernutt I, Mizen L. Temocillin efficacy in experimental *Klebsiella pneumoniae* meningitis after infusion into rabbit plasma to simulate antibiotic concentrations in human serum. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 1.705-1.719.
  21. Vermot D, Entenza JM, Vouillamoz J, Glauser MP, Moreillon P. Efficacy of clarithromycin versus that of clindamycin for single-dose prophylaxis of experimental streptococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 809-811.
  22. L'Heriteau F, Entenza JM, Lacassin F, Lepout C, Glauser MP, Moreillon P. RP 59500 prophylaxis of experimental endocarditis due to erythromycin-susceptible and -resistant isogenic pairs of *viridans* group streptococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1.425-1.429.
  23. Entenza JM, Blatter M, Glauser MP, Moreillon P. Parenteral sparflloxacin compared with ceftriaxone in treatment of experimental endocarditis due to penicillin-susceptible and -resistant streptococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 2.683-2.688.
  24. Entenza JM, Fluckiger U, Glauser MP, Moreillon P. Antibiotic treatment of experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* 1994; 170: 100-109.
  25. Woodnutt G, Berry V, Mizen L. Simulation of human serum pharmacokinetics of cefazolin, piperacillin, and BRL 42715 in rats and efficacy against experimental intraperitoneal infections. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1427-1431.
  26. Fluckiger U, Segessenmann C, Gerber AU. Integration of pharmacokinetics and pharmacodynamics of imipenem in a human-adapted mouse model. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1905-1910.
  27. Woodnutt G, Berry V, Kernutt I, Mizen L. Penetration of amoxicillin, ticarcillin and clavulanic acid into lymph after intravenous infusion in rabbits to simulate human serum pharmacokinetics. *J Antimicrob Chemother* 1990; 26: 695-704.
  28. Gerber AU, Stritzko T, Segessenmann C, Stalder B. Simulation of human pharmacokinetic profiles in mice, and impact on antimicrobial efficacy of netilmicin, ticarcillin and ceftazidime in the peritonitis-septicemia model. *Scand J Infect Dis* 1990; 74 (Supl): 195-203.
  29. Gerber AU, Kozak S, Segessenmann C, Fluckiger U, Bangerter T, Greter U. 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* 1989; 8: 233-237.
  30. Mizen L, Woodnutt G, Kernutt I, Catherall EJ. Simulation of human serum pharmacokinetics of ticarcillin-clavulanic acid and ceftazidime in rabbits, and efficacy against experimental *Klebsiella pneumoniae* meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 693-699.
  31. Woodnutt G, Catherall EJ, Kernutt I, Mizen L. Temocillin efficacy in experimental *Klebsiella pneumoniae* meningitis after infusion into rabbit plasma to simulate antibiotic concentrations in human serum. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 1.705-1.709.
  32. Hatano K, Wakai Y, Watanabe Y, Mine Y. Simulation of human plasma levels of beta-lactams in mice by multiple dosing and the relationship between the therapeutic efficacy and pharmacodynamic parameters. *Chemotherapy* 1994; 40: 1-7.
  33. Craig WA, Redington J, Ebert SC. Pharmacodynamics of amikacin in vitro and in mouse thigh and lung infections. *J Antimicrob Chemother* 1991; 27 (Supl C): 29-40.

## DISCUSIÓN

J.M. GATELL: ¿Cómo divides los intervalos de tiempo para realizar estas restas y recálculos sucesivos?

J. GAVALDÀ: Se trata de jugar con la hoja de cálculo. Es decir, debemos conseguir una velocidad de infusión que esté dentro de los intervalos que admite la bomba.

J.L. RODRÍGUEZ TUDELA: ¿Aparecen problemas de toxicidad con la farmacocinética humanizada en los animales? y ¿se comprueban las concentraciones séricas a modo de seguimiento para confirmar que los cálculos del ordenador han sido correctos?

J. GAVALDÀ: No aparecen problemas de toxicidad. En cuanto a tu segunda pregunta, los estudios se realizan en tres partes: en primer lugar, el estudio de farmacocinética en el animal; en segundo lugar, el modelo matemático y, en tercer lugar, se realiza la comprobación de todo ello en el animal.

J. CANTÓ: Lo presentado estaba básicamente realizado en el modelo de conejo. ¿Se produce este mismo efecto que diferencia la conducta o la respuesta del animal respecto al humano, por ejemplo, en otros modelos como en rata, perro, cerdo o primates?

J. GAVALDÀ: En animal no roedor no tengo constancia, aunque sí en rata. En rata se ha estudiado y se trabaja en modelos de endocarditis con farmacocinética humanizada y el comportamiento es idéntico; quizás un poco más marcado porque el metabolismo es más acelerado y la vida media resulta mucho más corta.

J. PACHÓN: En el modelo *in vivo* en animal infectado, ¿se ha comparado si utilizando farmacocinética humanizada o no humanizada hay diferencia en los resultados?

J. GAVALDÀ: No, esto no lo hemos comparado. Se trata de la eterna cuestión. Como bien sabes, en nuestros laboratorios es tremendamente complicado poner un estudio en marcha, conseguir que todo funcione correctamente y acabar el trabajo. Entonces, siempre nos planteamos que realizar estos estudios implicaría muchísimo trabajo y tiempo. Eso quiere decir, a lo mejor, uno o 2 años de trabajo simplemente para validar la necesidad o la obligatoriedad de utilizar farmacocinética humanizada. Parece recomendable que en estudios de eficacia terapéutica, la farmacocinética sea lo más parecido a la humana y por ello lo utilizamos.

---

# Modelo de endocarditis

---

Joan Gavalda<sup>a,\*</sup>, José María Miró<sup>b</sup> y Manuel Luis Fernández<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Servei de Malalties Infeccioses. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona. <sup>b</sup>Servicio de Enfermedades Infecciosas. IDIBAPS (Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer)-Hospital Clínic Universitari. Barcelona.

<sup>c</sup>División de Enfermedades Infecciosas. Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

---

## RESUMEN

Los modelos animales de infección han demostrado su eficacia para aumentar nuestro conocimiento de determinadas infecciones y de los factores que influyen en su tratamiento. Mientras que los métodos de sensibilidad *in vitro* ofrecen información sobre la actividad de un antimicrobiano ante un microorganismo en particular, su efectividad *in vivo* frente a determinadas infecciones puede ser diferente. Una de estas infecciones es la endocarditis infecciosa. Desde el principio de la era antibiótica se supo que la endocarditis infecciosa no podía tratarse de forma parecida a otras infecciones a pesar de que los resultados *in vitro* predijeran lo contrario. Dado que los métodos *in vitro* han demostrado ser inefectivos para predecir los fallos terapéuticos, fue necesario desarrollar un modelo animal en conejos o ratas que permitiera probar diferentes estrategias terapéuticas y conocer los factores determinantes del éxito o fracaso terapéutico. Del mismo modo, el modelo animal de endocarditis infecciosa ha permitido conocer aspectos muy importantes de la patogenia, fisiopatología y profilaxis antibiótica de esta infección. En este artículo revisamos los modelos animales de endocarditis infecciosa, así como las bases y avances de la profilaxis antibiótica de las endocarditis por estreptococos del grupo *viridans* y enterococo y del tratamiento de las endocarditis por estreptococos del grupo *viridans*, *Streptococcus bovis*, enterococo, *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis*.

### Palabras clave:

Endocarditis experimental. Profilaxis. Tratamiento.

---

## ENDOCARDITIS MODEL

Animal models of infection have proven extremely valuable in furthering our understanding of the factors that influence the chemotherapy of infectious diseases. While *in vitro* sensitivity testing of antibiotics may give general information regarding the activity against specific pathogen, the effectiveness of the drug *in vivo* in certain infections may be quite different. One of such infections is bacterial endocarditis. It was recognized quite early in the antibiotic era that bacterial endocarditis needed to be treated of different form that other infections although *in vitro* tests suggest other results. Since *in vitro* tests proved ineffective in predicting these therapeutic failures, it was necessary to develop an animal model of the disease in rabbits or rats to test the best therapeutic strategies and to know the factors that determine the success or failure of antibiotic treatment. Moreover, the animal model of endocarditis has been shown to be a reliable model for evaluation of physiopathology, pathogenesis and antibiotic prophylaxis of this infection. In this chapter we review the animal models of infective endocarditis and the basis and advances in the antibiotic prophylaxis of endocarditis caused by viridans group streptococci and enterococci and the antibiotic therapy of endocarditis caused by viridans group streptococci, *Streptococcus bovis*, enterococci, *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis*.

### Key words:

Experimental endocarditis. Prophylaxis. Therapy.

---

\*Correo electrónico: gavalda@hg.vhebron.es.

## Introducción

Los modelos animales de infección han demostrado su eficacia para aumentar nuestro conocimiento de determinadas infecciones y de los factores que influyen en su tratamiento. Mientras que los métodos de sensibilidad *in vitro* ofrecen información sobre la actividad de un antimicrobiano ante un microorganismo en particular, su efectividad *in vivo* frente a determinadas infecciones puede ser diferente. Una de estas infecciones es la endocarditis infecciosa. Desde el principio de la era antibiótica se supo que la endocarditis infecciosa no podía tratarse de forma parecida a otras infecciones, a pesar de que los resultados *in vitro* predijeran lo contrario. Dado que los métodos *in vitro* demostraron ser inefectivos para predecir los fallos terapéuticos, fue necesario desarrollar un modelo animal que permitiera probar diferentes estrategias terapéuticas y conocer los factores determinantes del éxito o fracaso terapéutico. Del mismo modo, el modelo animal de endocarditis infecciosa ha permitido conocer aspectos importantes y difíciles de investigar en humanos con esta infección, así como de la patogenia, fisiopatología, inmunología y profilaxis de esta infección.

## Descripción de los distintos modelos y de los factores que influyen en la patogenia y evolución de la endocarditis experimental

El primer modelo de endocarditis fue desarrollado en perros a finales de la década de los cincuenta e inicios de los sesenta por Hamburger<sup>1-3</sup>. En primer lugar, se inducía una insuficiencia aórtica mediante la escisión de un disco de 3 mm de las valvas de la válvula aórtica. Esta intervención se realizaba mediante un catéter de biopsia introducido a través de la aorta ascendente durante una toracotomía. A las 3 semanas de la intervención se inyectaban por vía intravenosa  $10^7$ - $10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC)/ml de *Staphylococcus aureus*. Entre un 55 y un 60 % de los animales desarrollaban endocarditis a los 4-12 días, que se manifestaba en forma de letargia, fiebre y bacteriemia. Los animales morían a los 6 días si no eran tratados y se podía demostrar endocarditis en la autopsia por cultivo e histología de las vegetaciones valvulares aórticas.

Sapico et al<sup>4,5</sup> también utilizaron el modelo de endocarditis en perros para evaluar la sinergia de la combinación de penicilina y estreptomina en el tratamiento de la endocarditis enterocócica. Mejoraron la técnica de Hamburger, ya que no practicaban toracotomía sino que lesionaban las

valvas aórticas mediante una aguja que se manipulaba a través de un catéter introducido por la arteria carótida. La mortalidad operatoria fue del 28 %. El 83 % de los animales a los que se les administraban  $10^7$  UFC/ml de *Enterococcus faecalis* desarrollaban endocarditis. La eficacia del tratamiento se evaluó mediante hemocultivos cuantitativos antes y después de la administración del antibiótico. Aunque este modelo produce infección endocárdica, la problemática de trabajar con animales de gran tamaño y la dificultad técnica que comporta restringe su uso en la actualidad. Todo ello a pesar de que, probablemente, los resultados podrían ser más extrapolables a la clínica humana porque la farmacocinética de los antimicrobianos en estos animales es más parecida a la del hombre.

El modelo de endocarditis en conejos fue desarrollado a principios de los setenta por Garrison, Perlman y Freedman<sup>6-8</sup>, y fue modificado posteriormente por Sande e Irwin<sup>9</sup>, Durack y Beeson<sup>10-13</sup> y Gutschik y Christensen<sup>14-20</sup>. Santoro y Levison<sup>21</sup> demostraron que la rata podía ser utilizada para el estudio de la endocarditis experimental inducida por cateterismo. Este modelo ofrecía las ventajas del coste y cuidado diario del animal sobre el modelo en conejos. Otros investigadores adoptaron este modelo con alguna modificación<sup>22</sup>. Imataka et al<sup>23,24</sup> desarrollaron un modelo experimental de endocarditis por estreptococos del grupo *viridans* en conejos a los que previamente se les había producido un prolapso mitral mediante estimulación vaginal cervical.

Overholser et al<sup>25</sup> desarrollaron una novedosa adaptación del modelo de endocarditis experimental inducida por cateterización para investigar la importancia de enfermedad periodontal preexistente (un mecanismo que se ha propuesto para la patogenia de la endocarditis humana). Provocaron una enfermedad periodontal en ratas alimentadas con dieta alta en sucrosa tras la manipulación de los dos primeros molares mediante su ligadura con seda. Después de la cateterización transcarotídea los dientes eran extraídos y posteriormente las ratas eran sacrificadas. Cerca de la mitad de las ratas (48 %) desarrollaron endocarditis infecciosa, a diferencia del 7 % de las ratas control sin enfermedad periodontal. En el siguiente estudio<sup>26</sup> intentaron relacionar los cultivos de muestras seriadas de sangre obtenida inmediatamente después de la extracción de los dientes con el desarrollo de endocarditis. Evidenciaron que ciertos microorganismos poseían unos factores de virulencia que les permitían producir endocarditis. Por otro lado, no hallaron una relación entre la intensidad de la bacteriemia



después de la extracción dentaria y el porcentaje de endocarditis producida. Esta observación contrastaba con estudios previos que utilizaban la inyección intravenosa del inóculo.

Grogan et al<sup>27</sup> desarrollaron en 1980 un sofisticado modelo de endocarditis protésica tricúspide en terneros. La endocarditis protésica precoz se producía tras la inyección  $10^2$ - $10^3$  UFC/ml de *S. aureus* en la prótesis durante la intervención quirúrgica. La endocarditis protésica tardía (inoculación 2 meses después de la intervención quirúrgica) se desarrolló en 6 de 6 terneros después de la inoculación intravenosa de más de  $10^7$  UFC/ml de *S. aureus*. Este modelo de endocarditis protésica experimental puede ser utilizado para: a) estudiar problemas técnicos en el reemplazamiento de válvulas protésicas; b) estudiar la historia natural de la endocarditis protésica valvular; c) valorar la eficacia de la profilaxis y del tratamiento, y d) observar la interacción de los componentes de la sangre y los microorganismos con el cuerpo extraño. Obviamente, la mayor desventaja de este modelo es que precisa un animal caro, de difícil estabulación y una técnica quirúrgica muy sofisticada.

El modelo de endocarditis en conejos es el más utilizado para los estudios terapéuticos y fisiopatológicos<sup>27a</sup>. Este modelo, al igual que el desarrollado en perros y ratas, se basa en la colonización y posterior infección de una lesión en la válvula aórtica producida por un catéter que se ha colocado previamente en el interior del ventrículo. La arteria carótida derecha es tunelizada por un catéter que se inserta a través de ella hasta pasar la válvula aórtica y alojarse dentro del ventrículo izquierdo. La colocación del catéter es relativamente sencilla, ya que cuando está en el interior del corazón se evidencian unas pulsaciones muy características. A pesar de ello, y para asegurar que el catéter atraviesa la válvula y queda en posición intracavitaria, es recomendable monitorizar la presión arterial a través del catéter. A los pocos minutos ya se observa una lesión valvular microscópica y a las 24 h son visibles, macroscópicamente, trombos de fibrina y plaquetas. Estas lesiones son muy susceptibles de ser colonizadas por microorganismos inyectados a través del catéter o por vía intravenosa. En el primer modelo desarrollado, Garrison y Freedman<sup>6-8</sup> colocaban un catéter que, previamente, había sido llenado con *S. aureus*. Con la intención de simular la patogenia de la endocarditis humana, Durack y Beeson<sup>10-13</sup> modificaron el modelo de Garrison usando una vía intravenosa periférica (vena marginal de la oreja) para inyectar el inóculo, produciendo así una bacteriemia transitoria.

Después de la adhesión de las bacterias a los trombos valvulares, se produce la infección por replicación de los microorganismos en el interior de la vegetación. El número de bacterias que debe inyectarse depende de la especie e incluso de la cepa a estudiar. La inyección intravenosa de  $10^3$ - $10^4$  UFC/ml de *S. aureus* puede producir infección<sup>7</sup>, mientras que son necesarias más de  $10^5$  UFC/ml de estreptococos del grupo *viridans*<sup>28</sup> o más de  $10^8$  UFC/ml de *Staphylococcus epidermidis*<sup>29</sup> para que se produzca endocarditis en los animales. Después de la inyección de las bacterias y una vez que se han adherido a la vegetación en un número suficiente, éstas se multiplican en su interior, acelerándose el depósito de plaquetas y fibrina con el consiguiente aumento de tamaño de la misma. Media hora después de la inoculación intravenosa de  $10^{10}$  UFC/ml de *Streptococcus sanguis* en un conejo con catéter intracavitario ya pueden encontrarse microorganismos en la superficie valvular<sup>13</sup>. A las 6 h ya se observan colonias y a las 24 h la concentración de bacterias en el interior de la vegetación oscila entre  $10^7$  y  $10^{10}$  UFC/g de vegetación. Los microorganismos se disponen entre capas de fibrina y de plaquetas apareciendo como una formación organizada<sup>13</sup>. Las vegetaciones crecen permanentemente por la continua adhesión de microorganismos circulantes. Estos gérmenes adheridos a la superficie de la vegetación estimulan la activación de tromboplastina tisular, que a su vez activa el proceso de la coagulación y el depósito de fibrina y plaquetas<sup>30</sup>.

Durack y Beeson<sup>11</sup> demostraron la existencia de dos poblaciones bacterianas diferentes en el interior de la vegetación mediante la incorporación de alanina tritiada a las vegetaciones. La primera se encuentra en las capas superficiales, está en fase de multiplicación exponencial, provoca la bacteriemia y mediante el mecanismo anteriormente comentado es responsable del crecimiento de la vegetación. La segunda, situada en el interior de la vegetación, está metabólicamente inactiva y, por tanto, sin replicación celular.

La valoración de la existencia o no de endocarditis se realiza mediante hemocultivos antes de iniciarse el tratamiento antibiótico. Se considera que los animales con hemocultivo positivo están afectados de endocarditis.

La presencia o ausencia del catéter en posición intracavitaria tiene gran influencia en la patogenia y evolución de la endocarditis experimental en conejos. Perlman y Freedman<sup>8</sup> demostraron que la endocarditis izquierda o derecha por *S. aureus* en conejos seguía activa mientras se mantenía el catéter. El curso de la in-

fección se modificaba cuando los catéteres eran retirados después de que los animales fueran infectados. El cambio era mayor en los animales con endocarditis derecha, ya que el 83 % de las vegetaciones se esterilizaban a la semana de la retirada del catéter, mientras que este hecho sucedía en el 57 % de los animales con endocarditis izquierda. Freedman y Valone<sup>31</sup> hallaron que para que la infección se estableciera era importante el tiempo transcurrido entre la retirada del catéter y la producción de la bacteriemia. Si la inyección intravenosa de las bacterias se producía a las 24 h de la retirada del catéter, la infección se desarrollaba en el 95 % de los conejos. Al contrario, sólo se infectaban el 56 % de los animales si la retirada se realizaba de 8 a 15 días después. Durack et al<sup>12</sup>, en sus primeros trabajos, también sugirieron que la susceptibilidad de los conejos a desarrollar infección endocárdica disminuía al aumentar el tiempo entre la cateterización y la producción de la bacteriemia. Pujadas<sup>32</sup> demostró que la endotelización del catéter y de las vegetaciones estériles, que se completaba a los 2-3 meses después de ser colocado el catéter, protegía a los animales de desarrollar endocarditis tras serles inyectados *Streptococcus mitis* por vía intravenosa. La presencia del catéter aumenta la gravedad de la infección y la dificultad para esterilizar las vegetaciones con el tratamiento. Este hecho no influye de igual manera en la eficacia de diferentes tratamientos antibióticos. Pelletier et al<sup>42</sup> en la endocarditis experimental por *S. sanguis* comprobaron que la retirada del catéter tenía mucho mayor efecto en el tratamiento con penicilina que con la combinación de penicilina y estreptomycinina.

Otro de los factores que influyen en la evolución de la endocarditis experimental es la localización de la infección en el ventrículo derecho o izquierdo. Al principio de los setenta<sup>6-8</sup> ya se observaron diferencias en la gravedad del proceso al comparar la infección estafilocócica producida en el lado derecho del corazón con la endocarditis izquierda. Mientras que los animales que desarrollaban endocarditis izquierda morían dentro de las 2 semanas de inducida la infección, los animales con endocarditis derecha sobrevivían a este período de tiempo. Así mismo, observaron que la concentración bacteriana en las vegetaciones derechas era mucho menor que la de las vegetaciones izquierdas. Por otra parte, como ya se ha comentado anteriormente<sup>6-8</sup>, la esterilización de las vegetaciones derechas, después de la retirada del catéter, acontecía con mayor frecuencia que en las vegetaciones izquierdas. Algunos años más tarde, Durack<sup>12</sup> halló resultados

similares en conejos con endocarditis por estreptococos del grupo *viridans*. Los factores propuestos para estas diferencias fueron que el crecimiento bacteriano en el lado izquierdo estaba favorecido por la mayor concentración de O<sub>2</sub> a este nivel y la posibilidad de que los factores de defensa del huésped estuvieran potenciados en el lado derecho del corazón. Bayer et al<sup>34,35</sup> también propusieron que la mayor pO<sub>2</sub> en las cavidades izquierdas era el factor más importante para el mayor número de UFC de *Pseudomonas aeruginosa* que se recuperaban de las vegetaciones del ventrículo izquierdo.

El tiempo transcurrido entre la infección y el inicio del tratamiento también influye en la eficacia de los antibióticos usados para la terapéutica de la endocarditis experimental. Cuanto más pronto se inicie el tratamiento mejores resultados se obtienen, incluso con fármacos sin eficacia clínica. Carrizosa et al<sup>36</sup> iniciaron el tratamiento de conejos con endocarditis enterocócica a diferentes períodos de tiempo después de la infección. Cuando se iniciaba a las 6 h de inducida la infección, la penicilina sola curaba a todos los animales en 3 días. Si se iniciaba a las 72 h, era totalmente inefectiva, incluso con pautas de 7 días de duración. La eficacia de la combinación de penicilina y estreptomycinina, gentamicina o sisomicina también disminuía al aumentar el tiempo transcurrido entre la infección y el inicio del tratamiento.

Los antibióticos utilizados se administran por vía intramuscular a menos que sea necesario el uso de la vía intravenosa, como en el caso de la vancomicina. La dosis, el intervalo de dosificación y la duración del tratamiento varían dependiendo del antibiótico usado, el microorganismo a estudiar y la hipótesis de trabajo. Para que las conclusiones puedan extrapolarse a la clínica humana es importante que la farmacocinética de los antibióticos utilizados sea lo más parecida posible a la que tiene en el ser humano. Generalmente, la dosis debe relacionarse con las concentraciones séricas y los intervalos de dosificación con la vida media del fármaco. Habitualmente la vida media de los fármacos es menor en conejos ya que su metabolismo es mayor. Para poder sobrellevar esta cuestión se han desarrollado los modelos animales de farmacocinética humanizada que no comentaremos y que se desarrollan en otro artículo de esta monografía.

La eficacia terapéutica puede ser evaluada por distintos parámetros: cultivos cuantitativos de las vegetaciones, riñones, proporción de hemocultivos positivos en los distintos días de tratamiento (porcentaje de erradicación de la bacteriemia), porcentaje de esterilización de las vegetaciones,

recidivas después de un determinado número de días tras la finalización del tratamiento y aparición de resistencias antibióticas durante el mismo. En caso de utilizar la concentración bacteriana de las vegetaciones como índice de la eficacia terapéutica, los animales son sacrificados después de un determinado número de tratamientos, las vegetaciones de la válvula aórtica son separadas de manera aséptica y cultivadas cuantitativamente. Las vegetaciones pueden también estar situadas en la raíz de la aorta y en la pared ventricular, pero Francioli et al<sup>37</sup> demostraron que la concentración bacteriana de estas lesiones era menor, a pesar de encontrarse a pocos milímetros de la válvula aórtica. Los resultados se expresan por convención como logaritmo<sub>10</sub> de UFC por gramo de vegetación (log<sub>10</sub> UFC/g), aunque el peso total de las vegetaciones raramente es mayor de 100-150 mg.

Las comparaciones estadísticas entre los diferentes grupos de tratamiento se llevan a cabo, a menudo, utilizando el método de la t de Student. Esta prueba estadística puede indicar falsamente ausencia de diferencia (error tipo II) cuando los datos no siguen una distribución normal y la variancia es amplia. Una prueba como la suma de clasificaciones de Mann-Witney es más apropiada en estos casos. Cuando se comparan tres o más grupos debe utilizarse la prueba de análisis de la variancia. No deben hacerse comparaciones múltiples con el prueba de la t de Student a menos que se realice la corrección de Bonferroni o de Scheffé. La valoración de eficacia por curación o recaída, tasa de erradicación de la bacteriemia o de vegetaciones estériles puede realizarse mediante la prueba de la  $\chi^2$  para comparaciones apareadas o múltiples.

Dado que existen diferencias en la patogenia, curso de la infección y farmacocinética de los antibióticos en el animal de laboratorio respecto a los humanos, es peligrosa la comparación directa o extrapolación a humanos para responder a problemas planteados en clínica humana. La eficacia terapéutica de un determinado régimen sólo debe ser interpretada tras la comparación de los resultados obtenidos con una pauta terapéutica con eficacia clínica demostrada.

### **Lecciones aprendidas del modelo animal para la profilaxis de la endocarditis infecciosa**

Dado que el riesgo de desarrollar endocarditis infecciosa tras una bacteriemia es muy bajo y no pueden realizarse estudios clínicos, el modelo animal de endocarditis experimental ha sido uti-

lizado para evaluar la eficacia de diferentes pautas antibióticas en la prevención de esta enfermedad. Se han empleado los modelos de conejo y rata. El catéter se coloca como mínimo 24 h antes de la infección y se deja implantado durante todo el experimento. Se administra una dosis de antibiótico 30 min antes de la inyección del inóculo bacteriano, y si se desea, una o varias dosis después. La eficacia de la profilaxis se evalúa mediante el sacrificio de los animales 24-72 h después de la administración de los antibióticos, determinando el porcentaje de animales infectados mediante el cultivo cuantitativo de las vegetaciones valvulares. Un grupo control sin tratamiento antibiótico debe también ser infectado y evaluado. Glauser et al<sup>38</sup> han sugerido que deben utilizarse una serie de inóculos, entre uno que infecte al 90 % de los animales inoculados (ID<sub>90</sub>) y otros con densidades entre 10 y 1000 veces superiores a la ID<sub>90</sub>. Estos investigadores han demostrado que la eficacia profiláctica es inóculo-dependiente para algunos antibióticos y microorganismos<sup>39,40</sup>. Los antibióticos administrados a los conejos o ratas deben de producir unas concentraciones séricas, en el momento de inyectar los microorganismos, similares a las que se obtienen en humanos con una determinada dosis y vía de administración. Las diferencias entre los distintos grupos de tratamiento y el grupo control se analizan con el método de la  $\chi^2$  o el de Fisher para valorar si existe significación estadística.

En el modelo de endocarditis por estreptococos del grupo *viridans*, Durack et al<sup>41</sup> demostraron que la penicilina sola era eficaz si se administraba a dosis elevadas y se continuaba durante 24 h más después de la inoculación. La vancomicina sola o penicilina o ampicilina combinadas con estreptomycin fueron efectivas en dosis única antes de la inoculación. Agentes bacteriostáticos como el cotrimoxazol, tetraciclinas, eritromicina o clindamicina no fueron eficaces<sup>41-44</sup>. Para la endocarditis experimental por *Enterococcus* sp. la administración de ampicilina o vancomicina con gentamicina en dosis única antes de la infección fue la pauta más eficaz<sup>45</sup>. Estos trabajos sugieren que es necesario que los antibióticos utilizados posean actividad bactericida. Sin embargo, estudios más recientes<sup>38-40,46-53a</sup>, sugieren que concentraciones subbactericidas, agentes considerados tradicionalmente como bacteriostáticos (p. ej., clindamicina o macrólidos) o antibióticos bactericidas en dosis única antes de la infección pueden también ser efectivas si el inóculo infectante es del orden de la ID<sub>90</sub>. Para ello es necesario que exista una actividad antibiótico inhibitoria como in-

nimo durante 6 h<sup>53b</sup>. En caso de utilizar inóculos de 10 a 1.000 veces el ID<sub>90</sub> son necesarias dosis plenas y suplementarias de β-lactámicos (en caso de estreptococos sensibles a penicilina) o de la combinación (para *Enterococcus* sp.). Los mecanismos que se apuntan para explicar estos resultados son: a) disminución de la adhesión de los microorganismos a los depósitos fibrino-plaquetarios de la válvula lesionada, y b) eliminación de la pequeña población bacteriana que existe en la vegetación en su fase más inicial. La eficacia de las dosis pequeñas implicaría que no sería necesario mantener una actividad bactericida sérica<sup>53b</sup>.

Parece razonable considerar que las pautas que aportan mayor seguridad, a partir de los datos generados en el modelo animal, serían las dosis múltiples de penicilina o amoxicilina para la profilaxis de la endocarditis por estreptococos del grupo *viridans* y la terapia combinada (ampicilina o vancomicina con gentamicina) para la prevención de la endocarditis enterocócica<sup>54</sup>. En el caso de la prevención de la endocarditis por estreptococos del grupo *viridans* sensibles a la penicilina, Rouse et al<sup>53a</sup> demostraron, utilizando una cepa de *S. milleri* (concentración mínima inhibitoria [CMI]/concentración mínima bactericida [CMB] < 0,125/ < 0,125 μg/ml), que la administración de dos dosis de amoxicilina, clindamicina, claritromicina o azitromicina era eficaz para prevenir el desarrollo de endocarditis en el 100, 100, 97,5 y 99 % de los animales, respectivamente. Sin embargo, la incidencia de resistencia a la penicilina en los estreptococos del grupo *viridans* está aumentando los últimos años y no se sabe si estos antibióticos pueden ser eficaces para prevenir la endocarditis por cepas resistentes a la penicilina. Miró et al<sup>55</sup> efectuaron un estudio para valorar la eficacia de los antibióticos recomendados para la profilaxis de la endocarditis por estreptococos del grupo *viridans* cuando la cepa era resistente a penicilina. Para ello utilizaron una cepa de *S. mitis* resistente a la penicilina (CMI/CMB 8/8 μg/ml) y tolerante a la clindamicina (CMI/CMB 0,03/ > 32 μg/ml) y los glucopéptidos (CMI/CMB 0,5/ > 128 μg/ml). El inóculo administrado fue igual a la ID<sub>90</sub>. En los resultados se observó que todos los animales del grupo control (n = 20) y los que recibieron amoxicilina (n = 21) o amoxicilina más gentamicina (n = 20) se infectaron. Por contra, la administración de clindamicina (n = 23), vancomicina (n = 22) o teicoplanina (n = 22) protegió a un 87, 82 y 95 % de los animales, respectivamente. Estos datos indican que si los niveles de resistencia a la penicilina aumentan en los estreptococos del grupo

*viridans*, deberá replantearse el papel de la amoxicilina como fármaco de primera elección para la prevención de este tipo de endocarditis.

Las respuestas a la pregunta sobre la importancia del tratamiento posterior a la aparición de la bacteriemia en la profilaxis de la endocarditis infecciosa experimental son controvertidas. Berney et al<sup>56</sup>, en un estudio de profilaxis con amoxicilina intravenosa en dosis única de la endocarditis infecciosa experimental en ratas por *S. sanguis*, demostraron que la administración de amoxicilina después de la infección era eficaz cuando el inóculo estaba alrededor del ID<sub>90</sub>. Al contrario, era ineficaz al aumentar el inóculo o si se administraba a partir de las 4 h de la infección. James et al<sup>57</sup> no pudieron demostrar lo mismo al administrar amoxicilina 6 h después de la infección con *S. sanguis* a conejos con endocarditis trombótica no bacteriana.

En ausencia de pautas antibióticas con probada eficacia clínica que puedan ser empleadas como estándar de referencia en los modelos animales, los resultados de estos experimentos son difíciles de trasladar a recomendaciones clínicas concretas. Petersdoff et al<sup>58</sup> critican una serie de hechos de los modelos animales de profilaxis como el uso de inóculos muy altos que son clínicamente irrelevantes, la presencia del catéter intracavitario y la farmacocinética diferente de los antibióticos. Probablemente, es razonable concluir que los regímenes terapéuticos eficaces bajo las estrictas condiciones estandarizadas por Durack<sup>41,45</sup> podrían ser eficaces en humanos. Por otra parte, los agentes que no ofrecen protección bajo condiciones menos estrictas no deberían ser considerados en la práctica clínica.

## Lecciones aprendidas del modelo animal para el tratamiento de la endocarditis infecciosa

### Principios generales de tratamiento

A través de los años han sido establecidos unos principios generales de tratamiento de la endocarditis infecciosa a partir de los resultados obtenidos en los estudios con el modelo animal.

1. Para obtener una curación absoluta es imprescindible el uso de antibióticos que actúen de forma bactericida. Los estudios histológicos han demostrado la ausencia de macrófagos y polimorfonucleares en el seno de la vegetación<sup>10</sup>. Es decir, la endocarditis infecciosa es una infección que acontece en un área donde las defensas del huésped están disminuidas. Por tanto, son ne-

cesarios antibióticos que eliminen la bacteria para lograr la esterilización de las vegetaciones. Los antibióticos que inhiben el crecimiento bacteriano (agentes bacteriostáticos) pueden esterilizar los hemocultivos y disminuir la fiebre, pero cuando se retira el tratamiento antibiótico, se produce un crecimiento bacteriano que lleva a la recaída de la infección. La tetraciclina fue ineficaz en el tratamiento de la endocarditis infecciosa experimental por estreptococos del grupo *viridans*<sup>43</sup>. Se ha demostrado antagonismo entre agentes bacteriostáticos y bactericidas en el modelo de endocarditis estreptocócica. La asociación de penicilina y cloranfenicol fue menos eficaz que el tratamiento con penicilina sola de la endocarditis infecciosa experimental estreptocócica<sup>59</sup>. En relación con lo anteriormente expuesto se ha evaluado el poder bactericida del suero (PBS) como un supuesto índice de eficacia durante el tratamiento antibiótico. El PBS es el efecto del suero del paciente junto con los antibióticos ante el microorganismo productor de la endocarditis infecciosa aislado de los hemocultivos. Los modelos animales han demostrado una correlación directa entre el PBS (con títulos de 1/8 a 1/16) y el éxito terapéutico<sup>60-62</sup>. Basándose en estos estudios, algunos autores han recomendado que el PBS valle debe ser mayor o igual a 1/8 durante el tratamiento de la endocarditis infecciosa en humanos<sup>63</sup>. A pesar de ello, en la bibliografía científica existe desacuerdo acerca del valor pronóstico del PBS en el tratamiento de la endocarditis infecciosa<sup>64,65</sup>. Algunos autores consideran que el PBS por sí sólo no puede predecir el éxito o el fracaso terapéutico. El PBS puede ser útil clínicamente para monitorizar concentraciones de antibiótico en suero y para demostrar que una determinada pauta antibiótica es bactericida.

2. La eliminación de los microorganismos durante el tratamiento de la endocarditis infecciosa es mucho más lenta que *in vitro*, lo que se debe a una serie de factores: *a)* la concentración bacteriana en la vegetación es extraordinariamente alta (> 10<sup>8</sup> UFC/g vegetación), mucho mayor que la densidad utilizada en el caldo de cultivo en los estudios de susceptibilidad *in vitro*. Debido a esto la actividad metabólica bacteriana en el interior de la vegetación está disminuida respecto a los cultivos en caldo<sup>11</sup>, y *b)* varios autores<sup>66,67</sup> han demostrado que la penetración de los antibióticos en el seno de la vegetación está disminuida o alterada.

Estos factores explican, en parte, la menor susceptibilidad bacteriana *in vivo* a muchos antimicrobianos, fundamentalmente de los betalactá-

micos, cuya actividad es mucho mayor ante microorganismos que se multiplican rápidamente. También podría explicar la aparición de recaídas cuando el período de tratamiento es corto<sup>68</sup>. Por tanto, la duración del tratamiento de la endocarditis infecciosa debe ser mayor que la de otras infecciones.

3. El porcentaje de letalidad bacteriana *in vitro* producido por antibióticos solos o en combinación puede predecir la erradicación de las bacterias de la vegetación infectada *in vivo*. La combinación de un betalactámico y un aminoglucósido, si actúan de manera sinérgica *in vitro* por curvas de letalidad, esterilizará más rápidamente las vegetaciones infectadas que el betalactámico solo.

#### *Tratamiento de la endocarditis infecciosa por estreptococos del grupo viridans y Streptococcus bovis*

En relación con este grupo de microorganismos, la capacidad bactericida de distintos agentes antimicrobianos o combinaciones de ellos *in vitro* ha sido, en general, predictiva del porcentaje de erradicación bacteriana de las vegetaciones *in vivo*.

En el modelo de endocarditis experimental por estreptococos del grupo *viridans* sensibles a penicilina pueden realizarse las siguientes observaciones:

1. El tratamiento con penicilina sola es eficaz<sup>9,33,44,60,61,69</sup>.

2. La adición de estreptomycinina o gentamicina a penicilina provoca una eliminación más rápida de los microorganismos de las vegetaciones (3-4 días) que el tratamiento con penicilina sola (7-10 días)<sup>9,44</sup>.

3. La administración de cloranfenicol, una hora antes de la dosis de penicilina, antagoniza la actividad bactericida de este antibiótico<sup>59</sup>, aunque la prolongación del tratamiento con penicilina también consigue esterilizar las vegetaciones.

4. El tratamiento puede complicarse por la aparición de estreptococos con tolerancia o resistencia moderada a penicilina. En el modelo animal: *a)* la combinación de penicilina y estreptomycinina es mejor que la penicilina sola, tanto en la prevención<sup>70</sup> como en el tratamiento de la infección<sup>71-74</sup>, y *b)* la combinación de penicilina y estreptomycinina es menos eficaz cuando los animales son infectados con una cepa penicilín-resistente que con una penicilín-tolerante<sup>72</sup>. A pesar de que faltan más estudios, se considera que existen suficientes datos generados por el modelo animal para recomendar el uso de tratamiento

combinado de betalactámicos más aminoglucósidos en estos casos.

5. El modelo de endocarditis experimental por estreptococos nutricional-deficientes fue descrito en 1985 por Van de Rijn<sup>75</sup>. A partir de este trabajo Bouvet et al<sup>76</sup> y Henry et al<sup>77</sup> han llevado a cabo dos trabajos más que nos permiten realizar las siguientes consideraciones: a) el tratamiento con penicilina más gentamicina o estreptomina es más eficaz que penicilina sola; b) la administración de vancomicina sola es tan eficaz como las pautas de penicilina más aminoglucósidos, y c) el tratamiento con vancomicina más aminoglucósido no es más eficaz que la vancomicina sola.

A diferencia de los estudios con otros estreptococos del grupo *viridans*, no existe una correlación total entre los resultados de las curvas de letalidad *in vitro* y los obtenidos *in vivo*. A pesar de ello, los resultados apoyan las recomendaciones del uso de penicilina más aminoglucósido para el tratamiento de la endocarditis por estas cepas y apuntan que la vancomicina sola podría ser suficiente en el paciente alérgico a penicilina, aunque faltan datos clínicos para confirmar este último punto.

6. Otra de las cuestiones relevantes en el tratamiento de la endocarditis experimental por estreptococos del grupo *viridans* es la dosis mínima de aminoglucósido que mantiene la sinergia *in vivo* de la combinación penicilina más aminoglucósido. Enzler et al<sup>28</sup> demostraron que la administración de gentamicina a dosis de 1,05 mg/kg (pico plasmático 3 µg/ml) era suficiente. Estos resultados en el modelo animal llevaron a recomendar que las concentraciones plasmáticas pico de gentamicina no deben superar 3 µg/ml en el tratamiento de la endocarditis infecciosa por estreptococos sensibles a penicilina en humanos.

7. La posibilidad del tratamiento oral de la endocarditis estreptocócica ha sido explorada por el grupo de Moreillon al evaluar la eficacia de trovafloxacin en el modelo. Pudieron constatar que, a la dosis utilizadas mediante farmacocinética humanizada que simulaban 200 mg/12 h, su eficacia fue inferior a la de la ceftriaxona<sup>78</sup>.

El modelo animal ha demostrado claramente que la adición de un aminoglucósido a penicilina acelera la eliminación de estreptococos del grupo *viridans* de las vegetaciones. Estas observaciones sirvieron de base a los estudios clínicos de Wilson et al<sup>79</sup> para demostrar que la pauta de 2 semanas de tratamiento con penicilina más estreptomina era tan efectiva como el tratamiento con penicilina sola durante 4 semanas.

*Tratamiento de la endocarditis infecciosa por Enterococcus sp.*

*E. faecalis* y *Enterococcus faecium* son mucho más resistentes a los antibióticos betalactámicos que los estreptococos del grupo *viridans* y que *S. bovis* con CMI a penicilina G 10-100 veces superiores. Los enterococos toleran uniformemente los agentes activos ante la pared celular, con CMB 100 veces superiores a sus CMI<sup>80,81</sup>.

Los estudios en el modelo experimental de endocarditis infecciosa por *E. faecalis* y *E. faecium* han demostrado poca actividad del tratamiento con penicilina sola. La eficacia de las penicilinas (penicilina o ampicilina) aumenta al añadir gentamicina o estreptomina<sup>14,20,36,82,83</sup>. Desde mediados de los años sesenta, se ha descrito un porcentaje creciente de cepas con un alto nivel de resistencia a estreptomina (CMI > 2.000 µg/ml). Este fenómeno se asocia a ausencia de sinergia con la penicilina. Estas cepas continúan siendo relativamente sensibles a la gentamicina y mantienen la sinergia con la penicilina<sup>84-86</sup>. Los estudios en el modelo animal de endocarditis infecciosa han corroborado los resultados de los estudios *in vitro*. Cuando la CMI a estreptomina es superior a 2.000 µg/ml, este antibiótico no aumenta la acción de la penicilina, mientras que la gentamicina mantiene la sinergia<sup>14,60,83</sup>. Basándose en estos hallazgos, se ha recomendado que la asociación de penicilina y gentamicina debe utilizarse para tratar infecciones causadas por cepas con un alto nivel de resistencia a estreptomina, aunque no está totalmente demostrado en estudios clínicos que la estreptomina sea totalmente ineficaz<sup>87</sup>. La netilmicina y la sisomicina también resultan eficaces en el modelo animal de endocarditis enterocócica<sup>60,62</sup>. Es interesante destacar que la gentamicina sola posee una cierta eficacia en el tratamiento de la endocarditis enterocócica experimental, a pesar de que los pruebas *in vitro* demuestran una resistencia relativa<sup>88</sup>.

La toxicidad relacionada con el uso de aminoglucósidos está presente en un número importante de pacientes, fundamentalmente ancianos<sup>89</sup>. Estudios *in vitro*<sup>90</sup> han demostrado que numerosas cepas mantienen la sinergia entre la penicilina y un aminoglucósido, incluso con concentraciones muy bajas de este último<sup>90</sup>. Estos resultados sugieren que los aminoglucósidos podrían administrarse a dosis muy bajas, reduciéndose el riesgo de toxicidad y manteniéndose una adecuada actividad bactericida en sangre. Dos grupos han investigado esta cuestión en el modelo animal con diferen-

tes resultados. Carrizosa y Levison<sup>82</sup> trataron a ratas con endocarditis experimental por *E. faecalis* con penicilina y diferentes dosificaciones de gentamicina. Dosis bajas de gentamicina fueron menos eficaces que dosis mayores a pesar de que ambos regímenes presentaban sinergia *in vitro*. Henry y Wilson<sup>91</sup> no hallaron diferencias en la eficacia de penicilina más dosis bajas de estreptomocina (pico sérico 9,2 µg/ml) frente a la misma combinación con dosis alta de estreptomocina (pico sérico 26,8 µg/ml).

La ampicilina es más activa que la penicilina en las pruebas de susceptibilidad *in vitro* ante *E. faecalis* y a menudo sustituye a la penicilina en el tratamiento de la enfermedad en humanos. No existe ningún estudio que compare directamente ampicilina y penicilina en el modelo animal, aunque Tight<sup>92</sup> curó a conejos con 21 días de tratamiento con ampicilina sola manteniendo las concentraciones séricas siempre por encima de la CMB. La vancomicina se ha usado como sustituto de la penicilina en humanos y los resultados en el modelo experimental corroboran este hecho<sup>93</sup>. Nuevos glucopéptidos como la teicoplanina y la daptomicina también se han probado en el modelo animal. El tratamiento con teicoplanina ha resultado ser tan eficaz como con ampicilina<sup>93,94</sup> o con vancomicina<sup>94</sup> en el modelo animal. La administración de daptomicina fue menos eficaz que el tratamiento con penicilina o vancomicina. Sin embargo, la combinación de daptomicina más gentamicina fue más eficaz que la daptomicina sola, igual que penicilina más gentamicina y menos eficaz que vancomicina más gentamicina<sup>95</sup>. Las combinaciones de penicilinas isoxazólicas (metecilina, nafcilina u oxacilina) con gentamicina fueron ineficaces<sup>96</sup>. La asociación de cefalotina más gentamicina fue eficaz sólo si la dosis de cefalotina era 10 veces superior a la CMI de la cepa infectante<sup>97</sup>, dosis fuera del intervalo terapéutico en humanos. El imipenem no es bactericida *in vitro* ante enterococo e, incluso combinado con gentamicina o estreptomocina, es menos eficaz en el modelo experimental de endocarditis infecciosa que ampicilina más gentamicina<sup>98,99</sup>. El tratamiento con ciprofloxacino solo o en combinación con gentamicina fue menos eficaz que la penicilina sola o combinada con gentamicina. La asociación de penicilina más ciprofloxacino no fue más eficaz que la penicilina sola<sup>100</sup>. A pesar de que el cotrimoxazol tiene buena actividad *in vitro* frente a *E. faecalis*, este antibiótico fue menos eficaz que la ampicilina sola en el modelo animal<sup>101</sup>. El tratamiento con mezlocilina fue más efectivo que la ampicilina en conejos con endocarditis experimental enterocócica.

La adición de gentamicina aumentó la actividad de las dos penicilinas, y la eficacia de ambas pautas resultó similar. En este último estudio la dosis utilizada de mezlocilina fue excesivamente elevada<sup>102</sup>.

En los últimos años se han descrito aislamientos de enterococos con alta resistencia a penicilina por producción de una betalactamasa. La resistencia de estas cepas a penicilina no se detecta por las pruebas de rutina de susceptibilidad en disco, debido a un efecto inóculo. Cuando se usa un inóculo bajo la cepa parece sensible, pero con un inóculo elevado (10<sup>7</sup> UFC/ml) son resistentes con CMI superiores a 500 µg/ml<sup>103</sup>. La ausencia de eficacia de la penicilina ante estas cepas se ha confirmado en estudios con el modelo animal<sup>104,105</sup>. En estos estudios se demuestra que el tratamiento con ampicilina más un inhibidor de la betalactamasa (ácido clavulánico o subactam) fue más eficaz que ampicilina o penicilina sola y con una eficacia similar a la vancomicina y la daptomicina.

La aparición de enterococos con alta resistencia (CMI > 2.000 µg/ml) a todos los aminoglucósidos ha complicado el tratamiento de las infecciones graves por este microorganismo que requieren la adición del aminoglucósido (endocarditis, meningitis, osteomielitis y pacientes neutropénicos), lo que se debe a que este nivel de resistencia elimina, de manera invariable, la esperada sinergia entre el aminoglucósido y el inhibidor de la síntesis de la pared celular bacteriana<sup>106</sup>. La primera descripción de alta resistencia y pérdida de sinergia fue para la estreptomocina. El problema actual se basa en cómo tratar a los pacientes con endocarditis enterocócica causada por cepas con alta resistencia a todos los aminoglucósidos. Queda claro, por estudios *in vitro* y en el modelo animal, que la adición de un aminoglucósido a un agente activo ante la pared celular no añade beneficio alguno<sup>95,106</sup>. Thauvin et al<sup>107</sup>, en un estudio de endocarditis experimental en rata producida por una cepa altamente resistente a gentamicina, demostraron que la infusión continua de ampicilina a dosis elevada era más eficaz que su administración fraccionada. Esta observación no pudo ser corroborada por el grupo de Wilson en el mismo modelo experimental en conejos<sup>108</sup>. Hay que tener en cuenta que la cepa utilizada en el primer estudio no presentaba tolerancia a ampicilina, mientras que la utilizada en el segundo sí la presentaba. Otros estudios *in vitro* y en el modelo animal con otros antibióticos (vancomicina, imipenem, ciprofloxacino o daptomicina) no han aportado ninguna solución a este problema<sup>95,99,100,106,109-112</sup>. Recientemente, Ga-

valdà et al<sup>113</sup> han comunicado la existencia de sinergia *in vitro* entre ampicilina y ceftriaxona frente a 9 cepas de *E. faecalis* con resistencia de alto nivel a aminoglucósidos. En este mismo trabajo demuestran que el tratamiento con esta combinación, a dosis simuladas en los animales de 2 g/4 h de ampicilina y de 2 g/12 h de ceftriaxona, podría ser eficaz en conejos con endocarditis experimental inducida por estas cepas.

Actualmente, y en espera de estudios más satisfactorios, parece razonable que el paciente con endocarditis causada por *Enterococcus* sp. con alta resistencia a aminoglucósidos sea tratado con ampicilina a dosis de 2 g/4 h asociada a 4 g al día de ceftriaxona, planteándose el recambio valvular precoz en los casos con mala evolución o en las recidivas.

La problemática del tratamiento de las infecciones causadas por *Enterococcus* sp. con resistencia a glucopéptidos no ha podido ser resuelta hasta el momento. Diversos estudios en los que se ha utilizado el modelo animal de endocarditis experimental han abordado esta cuestión sin encontrar resultados aplicables a clínica humana. Landam et al<sup>114</sup> demostraron que la combinación de ampicilina y ciprofloxacino era menos eficaz que ambos antibióticos en solitario. Este mismo grupo evidenció que las combinaciones de penicilina y ramoplanina<sup>115</sup> o penicilina y clinafloxacin<sup>116</sup> disminuían significativamente la concentración bacteriana de las vegetaciones y eran más eficaces que los antibióticos en solitario, pero no tienen aplicación clínica porque ni ramoplanina ni clinafloxacin están comercializadas. Brandt et al<sup>117</sup> demostraron que la combinación de ampicilina e imipenem podría ser muy activa, aunque no lo corroboraron en más de una cepa, por lo que este hallazgo podría ser característico de cepa y no de especie. Finalmente, aunque las combinaciones de vancomicina, gentamicina y penicilina<sup>118</sup> o ceftriaxona<sup>119</sup> han demostrado poseer una eficacia muy importante en el modelo de endocarditis experimental producida por estas cepas, los estudios de recaída evidenciaron la aparición entre el 10 y el 20 % de resistencias a la combinación. Este último dato desecha su utilización en clínica humana. Por tanto, en la actualidad no existe un tratamiento demostrado eficaz para la endocarditis producida por *Enterococcus* sp. con resistencia a glucopéptidos.

### **Tratamiento de la endocarditis infecciosa por *S. aureus***

Hamburger et al<sup>1-3</sup> fueron los primeros investigadores que estudiaron la endocarditis estafilo-

cócica experimental y hallaron que la erradicación de los microorganismos de las vegetaciones requería un antibiótico bactericida (oxacilina) administrado durante un período de tiempo prolongado. Un antibiótico bacteriostático como la tetraciclina fue ineficaz para esterilizar las vegetaciones, apareciendo resistencias durante el tratamiento<sup>3</sup>.

En el modelo de endocarditis experimental por *S. aureus* sensible a meticilina en ratas o conejos, los animales pueden ser curados con 5-10 días de tratamiento con un antibiótico bactericida, tanto si la endocarditis es derecha<sup>119a</sup> como izquierda<sup>120</sup>. La adición de un aminoglucósido reduce el tiempo de esterilización de las vegetaciones a la mitad. El tratamiento con meticilina, nafcilina y oxacilina tiene igual eficacia a pesar de existir diferencias en su actividad intrínseca y farmacocinética<sup>120</sup>.

Los resultados de los estudios que evalúan las diferencias en la eficacia entre las pautas de tratamiento con cefalosporinas o penicilinas son contradictorios. En un primer estudio, Carrizosa et al<sup>61</sup> demostraron que el tratamiento con meticilina o nafcilina disminuía la concentración bacteriana en las vegetaciones más rápidamente que cefazolina o cefalotina. Estos mismos autores, en un estudio posterior en el que utilizaron la misma cepa, no pudieron corroborar estas diferencias. Fernández-Guerrero et al<sup>121</sup> no encontraron diferencias entre la nafcilina y la cefazolina. Steckelberg et al<sup>122</sup> evidenciaron que la nafcilina fue más activa que ceftizoxima, ceftriaxona, cefotaxima, cefoperazona, cefuroxima o cefazolina. Cefpiroma y ceftazidima fueron las cefalosporinas de amplio espectro más activas, tan eficaces como nafcilina y más efectivas que ceftizoxima o cefotaxima. La eficacia terapéutica se relacionaba con la CMI del antibiótico frente a *S. aureus*, excepto en el caso de ceftacídima. Otros antimicrobianos que han demostrado ser eficaces en la endocarditis experimental por *S. aureus* son la vancomicina<sup>120</sup>, la teicoplanina<sup>123-125</sup>, la daptomicina<sup>124,126-128</sup>, el imipenem<sup>129,130</sup>, la ticarcilina-ácido clavulánico<sup>131</sup> y la clindamicina a dosis altas<sup>132</sup>.

Un número importante de cepas de *S. aureus* presentan sinergia ante la combinación de un betalactámico y un aminoglucósido<sup>133</sup>. Este hecho también se demuestra en el modelo animal<sup>120,134,135</sup>. La adición de un aminoglucósido reduce el tiempo de esterilización de las vegetaciones a la mitad<sup>134</sup>. Estos resultados sugirieron que la combinación podría tener su utilidad en clínica humana. En los estudios clínicos subsiguientes<sup>136-138</sup> se observó que se producía una reducción de los días de bacteriemia y de fiebre,



aunque no se pudo demostrar una disminución de la tasa de mortalidad respecto a los pacientes tratados sin la adición de un aminoglucósido. La posibilidad de la existencia de un efecto beneficioso sobre la mortalidad que no fuese reconocido (error  $\beta$ ) es considerable dado el número reducido de pacientes incluido en los estudios.

Las quinolonas han sido evaluadas en el modelo de endocarditis experimental estafilocócica<sup>78,121,139-153</sup>. Un buen número de estudios han demostrado que estos antimicrobianos presentan una eficacia similar a las pautas habituales. Por otra parte, la combinación de ciprofloxacino y rifampicina fue superior a cada uno de ellos por separado<sup>121,141</sup>. Este último estudio fue la base para su utilización con éxito en el tratamiento de pacientes con endocarditis estafilocócica tricúspide. Sin embargo, una serie de estudios plantean dudas relacionadas con el tratamiento con quinolonas. Por un lado, un trabajo en el que se comparaba pefloxacin y vancomicina<sup>150</sup> refirió que la segunda producía un inicio más rápido del efecto antimicrobiano. Por otra parte, diferentes trabajos sobre endocarditis estafilocócica<sup>144-149</sup> han demostrado la aparición de resistencias durante el tratamiento con ciprofloxacino.

Existen algunos hechos a destacar entre los estudios que valoran la eficacia de distintos tratamientos en la endocarditis infecciosa producida por *S. aureus* metilicilín-resistentes (SARM). Algunos aislamientos metilicilín-resistentes pueden parecer sensibles a cefalosporinas por los métodos de dilución en caldo o de difusión en agar. Es objeto de discusión si las infecciones causadas por estas cepas pueden ser tratadas con cefalosporinas. Chambers et al<sup>154</sup> demuestran que la cefazolina no es eficaz en el tratamiento de la endocarditis infecciosa experimental por cepas metilicilín-resistentes y cefazolín-sensibles. Los conejos infectados con esta cepa que recibían cefazolina durante 4 días tenían una densidad bacteriana en la vegetación de 7,5 log UFC/g, mientras que si eran tratados con vancomicina la densidad era de 3,6 log UFC/g. Cuando la cepa infectante era metilicilín-sensible, la cefazolina fue tan eficaz como la vancomicina. Así mismo, el tratamiento con cefalotina aumentó la expresión de la resistencia a betalactámicos en las cepas metilicilín-resistentes durante el tratamiento. Estos autores concluyen que las cefalosporinas no deberían ser usadas en el tratamiento de infecciones graves por *S. aureus* metilicilín-resistente, aunque los estudios *in vitro* demuestren susceptibilidad.

La utilización de un betalactámico asociado a un inhibidor de las betalactamasas (ácido clavu-

lánico o sulbactam) para el tratamiento de infecciones por cepas metilicilín-resistentes es una cuestión muy interesante. Varios estudios<sup>155-159</sup> han demostrado una eficacia similar de esta combinación ante cepas metilicilín-sensibles o resistentes y en este último caso sin diferencias con vancomicina. Esto podría deberse a una gran afinidad de amoxicilina o ampicilina a la nueva PBP (*Penicillin Binding Protein*) que aparece en estas cepas (PBP 2a) junto a la función de inhibición no competitiva de las betalactamasas por parte del ácido clavulánico o del sulbactam<sup>160</sup>.

Otra asociación que ha demostrado su eficacia en estudios experimentales es la de fosfomicina y antibióticos betalactámicos como imipenem o ceftriaxona. Marco et al<sup>161</sup> demostraron en estudios *in vitro* la actividad sinérgica y bactericida de esta combinación frente a 9 cepas de SARMA procedentes de diversos hospitales españoles. En el modelo experimental de endocarditis por SARM, Miró et al<sup>161</sup> demostraron la sinergia *in vivo* de fosfomicina y ceftriaxona o imipenem administrados siguiendo un modelo de farmacocinética humanizada, por lo que los animales eran tratados de manera que simulaban la dosis de 2 g de fosfomicina cada 6 h i.v., 2 g de ceftriaxona cada 24 h i.v. y 1 g de imipenem cada 6 h i.v. que serían las dosis a administrar en humanos. Tras 2 días de tratamiento, la combinación de fosfomicina más un betalactámico resultó significativamente más efectiva que la administración de 1 g de vancomicina cada 12 h i.v. siguiendo el modelo de farmacocinética humanizada ( $p < 0,05$ ). El 73 % de los animales ( $n = 25$ ) tratados con fosfomicina e imipenem y el 62 % de los que recibieron fosfomicina y ceftriaxona ( $n = 16$ ) tuvieron vegetaciones estériles, mientras que esto sólo ocurrió en el 31 % de los animales ( $n = 16$ ) que fueron tratados con vancomicina. En el grupo de fosfomicina en monoterapia, la tasa de aparición de resistencia fue de un 42 %, mientras que no se detectó resistencia a la fosfomicina en los grupos que recibieron la combinación de fosfomicina y un betalactámico.

Resumiendo los estudios de endocarditis experimental por SARM o por SARMA (*S. aureus* resistente a la metilicina y a los aminoglucósidos) puede afirmarse que el cotrimoxazol es menos eficaz que la vancomicina<sup>162</sup> y que a excepción de la combinación de fosfomicina con imipenem o ceftriaxona<sup>161,163</sup>, ninguno de los tratamientos estudiados en el modelo de endocarditis por SARM o por SARMA ha demostrado ser *más eficaz* que la vancomicina sino *tan ineficaz* como la misma. Los tratamientos que cumplen esta pre-

misa son los siguientes: trovafloxacin<sup>78,151</sup>, levofloxacin<sup>164</sup>, el nuevo glucopéptido LY333328<sup>165</sup>, vancomicina más netilmicina<sup>166</sup>, ampicilina-sulbactam más rifampicina<sup>167</sup> y vancomicina más ácido fusídico<sup>168</sup>.

En los últimos años la descripción de cepas de SARM con resistencia intermedia a la vancomicina (GISA) ha incrementado un problema ya grave por sí mismo. Los estudios preliminares *in vitro* e *in vivo* de Climo<sup>169,170</sup> demuestran que la combinación de vancomicina y cloxacilina es sinérgica frente a estas cepas, hecho que debe confirmarse en más estudios.

### **Tratamiento de la endocarditis infecciosa por *S. epidermidis***

*S. epidermidis* es el agente etiológico más frecuente en la endocarditis protésica precoz. La mayoría de los aislamientos clínicamente significativos son meticilín-resistentes pero frecuentemente son sensibles a vancomicina, gentamicina y rifampicina<sup>171</sup>. Los métodos *in vitro* a menudo indican susceptibilidad a las cefalosporinas pero, como en el caso de *S. aureus* meticilín-resistente, aparecen subpoblaciones heterorresistentes en las cepas meticilín-resistentes<sup>171,172</sup>. La resistencia a rifampicina se desarrolla *in vitro* de manera muy rápida<sup>171</sup> debido a una alta frecuencia de mutación por resistencia ribosómica. El uso de un segundo antibiótico en combinación previene de manera uniforme la aparición de cepas resistentes<sup>173</sup>.

Todos los estudios en el modelo animal se han realizado con cepas de *S. epidermidis* meticilín-resistentes. El tratamiento con nafcilina, meticilina, cefalotina y cefamandol es ineficaz<sup>174,175</sup>. Lowy et al<sup>175</sup> observaron un aumento de la proporción de las subpoblaciones cefalotín y meticilín-resistentes en el interior de las vegetaciones durante el tratamiento con cefalotina. Este hecho es similar al observado con cepas de *S. aureus* meticilín-resistente. Sin embargo, Vazquez y Archer<sup>174</sup> no detectaron este fenómeno.

La vancomicina, la gentamicina y la rifampicina poseen actividad *in vivo* cuando se usan por separado<sup>174,175</sup>. El tratamiento con rifampicina sola no es efectivo, ya que implica la aparición de resistencias durante el tratamiento<sup>174</sup>. Sorprendentemente, el uso de cefalotina más rifampicina no previno la aparición de resistencias a este último antibiótico<sup>171</sup>. Las diferentes combinaciones con los antibióticos anteriores son tan o más efectivas que los antibióticos administrados por separado<sup>171,175</sup>. Las combinaciones más activas fueron vancomicina-rifampicina o vancomi-

cina-rifampicina-gentamicina. La ausencia de eficacia de los betalactámicos y la rifampicina cuando se utilizan solos y la actividad de las combinaciones observada en el modelo animal han influido en el diseño de esquemas terapéuticos en los humanos. Las recomendaciones actuales incluyen vancomicina y rifampicina con o sin gentamicina frente a *S. epidermidis* meticilín-resistente y penicilinas isoxazólicas con o sin gentamicina para las cepas meticilín-sensibles.

### **Principios de dosificación antibiótica aprendidos del modelo animal**

El modelo animal de endocarditis ha sido utilizado en muchos casos para estudiar las condiciones que influyen en la actividad *in vivo* de los antibióticos y, especialmente, la importancia de la dosificación en su eficacia.

Es necesario considerar el patrón de distribución de los antibióticos en las vegetaciones infectadas antes de valorar la importancia de las diferentes pautas de dosificación en la eficacia *in vivo*. Gengo et al<sup>176</sup> evaluaron la distribución de la meticilina administrada en infusión continua en valvas cardíacas lesionadas o normales de conejos. Demostraron que las concentraciones de meticilina en las valvas lesionadas eran superiores que en las valvas normales. En otro estudio<sup>177</sup> demostraron que después de la administración intermitente de meticilina a los animales, la curva farmacocinética en las valvas aórticas lesionadas fue similar a la del suero. La concentración en las valvas lesionadas se equilibró rápidamente con la concentración sérica, mientras que en las valvas normales y en el músculo la concentración de meticilina era siempre menor que la sérica. Se consideró que el equilibrio alcanzado entre las valvas lesionadas y el suero se debía a que éstas están compuestas por plaquetas y fibrina y no tienen la integridad del tejido valvular normal. Contrepolis et al<sup>178</sup> demostraron que el moxalactam y la gentamicina penetraban rápidamente en las vegetaciones después de una infusión intravenosa rápida, con valores pico que aparecían al mismo tiempo que en el suero. Así mismo, la vida media de los antibióticos en las vegetaciones y en el plasma fue idéntica. Estos autores también comprobaron que las concentraciones de antibióticos eran menores en las vegetaciones infectadas que en las que no lo estaban. Estos estudios demostraron que las vegetaciones infectadas son un foco de intercambio rápido con el plasma, y que las concentraciones locales de antibióticos pueden ser fácilmente modificadas por cambios en la dosis y en el modo de administración del fáрма-

co. También sugieren que las concentraciones séricas pueden ofrecer una información indirecta de las concentraciones antibióticas en las vegetaciones cardíacas, ya que la vida media es similar en ambos compartimientos. Sin embargo, hay que considerar que estos datos están generados por la determinación de las concentraciones antibióticas de los homogeneizados de vegetaciones cardíacas, sin considerar la posible heterogeneidad de la difusión de los antibióticos hacia su interior. Este hecho fue comprobado por Cremieux et al<sup>67</sup> mediante autorradiografía de las vegetaciones tras la administración de diferentes antibióticos marcados con <sup>14</sup>C.

## Antibióticos administrados en solitario

### 1. *Betalactámicos*

Diversos estudios en este modelo corroboran los conceptos obtenidos por Eagle en la década de los cincuenta en infecciones agudas en ratones tratados con penicilina. Carrizosa y Kaye<sup>60</sup> trataron a animales con endocarditis por *S. sanguis* con penicilina a diferentes dosis, intervalos de dosificación y duración del tratamiento. Fue necesaria una dosis mínima para producir la muerte bacteriana; dosis de 18.750 U/6 h durante 10 días fueron ineficaces, mientras que la misma dosis total administrada como 37.500 U/6 h durante 5 días fue eficaz. Así mismo, se observó un intervalo crítico de dosificación: dosis de 37.500 U/6 h fueron ineficaces y la misma dosis administrada cada 12 h en un número igual de dosis fue un fallo terapéutico.

Gengo et al<sup>179</sup> examinaron las condiciones que influían en la eficacia *in vivo* de meticilina en el modelo animal de endocarditis estafilocócica. Todos los animales recibían la misma cantidad total de meticilina, pero las dosis e intervalos de dosificación variaban. La eficacia de los grupos de tratamiento con intervalos de 4 a 8 h era similar, mientras que cada 12 h era generalmente menor o ineficaz. Con la infusión continua de meticilina se conseguían concentraciones séricas iguales a la CMB del microorganismo, pero eran menos eficaces que las pautas de administración intermitente cuyas concentraciones séricas superaban en varias veces la CMB. Este último hecho demostraba que la mínima dosis eficaz debía conseguir concentraciones plasmáticas que excedieran significativamente la CMB. Estos autores demostraron que la eficacia de los betalactámicos dependía fundamentalmente del tiempo durante el cual las concentraciones séricas per-

manecían por encima de la CMB y de la duración, si es que existía, del efecto postantibiótico.

Thauvin et al<sup>107</sup> en el tratamiento de la endocarditis enterocócica experimental hallaron que la infusión continua de ampicilina era más eficaz que la administración intramuscular fraccionada. La vida media muy corta (0,8 h) de la ampicilina intramuscular podría ser la causa del fallo terapéutico, ya que aunque las concentraciones plasmáticas eran altas (54 mg/l) los intervalos de dosificación eran cada 8 h. En un modelo similar utilizando una cepa de enterococo con alta resistencia a aminoglucósidos, el grupo de trabajo de Wilson<sup>105</sup> no halló los mismos resultados puesto que la eficacia de la ampicilina en infusión continua fue similar a la pauta de 100 mg/kg i.m. tres veces al día. Estos dos trabajos son de difícil comparación ya que hay muchas variables experimentales diferentes entre sí: a) la especie animal utilizada (rata frente a conejo); b) la duración del tratamiento (4 frente a 3 días), y c) la susceptibilidad a ampicilina de la cepa de enterococo utilizada (CMI/CMB ampicilina [-μg/ml] 1/1 frente a 2/ > 256).

Cometta et al<sup>180</sup> demostraron que dosis crecientes de penicilina G benzatina que alcanzaban valores de 20, 40, 500 y 1.000 veces la CMI no aumentaban la letalidad *in vivo*, resultados similares a los hallazgos *in vitro* (porcentaje de letalidad de penicilina G constante, a pesar de aumentar la concentración del fármaco: 2 × CMI, 10 × CMI y 100 × CMI).

Con las cefalosporinas se ha demostrado que la ceftriaxona es eficaz al ser administrada una vez al día a conejos con endocarditis experimental por *Escherichia coli*. Se halló una relación lineal entre: a) las concentraciones de antibiótico sérico y en la vegetación, y b) la densidad bacteriana de la vegetación y la concentración que el antibiótico alcanzaba en su interior<sup>181</sup>. El aumento de la eficacia de la ceftriaxona por el incremento de la dosis unitaria podría deberse al mayor tiempo durante el que las concentraciones plasmáticas del fármaco se encuentran por encima de la CMB o a la penetración aumentada del fármaco en el seno de la vegetación. Esta última consideración fue demostrada por Cremieux et al<sup>182</sup> utilizando una técnica de autorradiografía de las vegetaciones después de la infusión i.v. de ceftriaxona-<sup>14</sup>C en conejos. Demostraron que: a) hay un gradiente de concentración de la periferia hacia al seno de la vegetación, y b) que este gradiente es menor cuando el estudio se realiza una vida media después de la infusión respecto a si se realiza 30 min después de la administración i.v. del fármaco.

Todos estos estudios con betalactámicos apoyan el concepto de que se deben inducir valores séricos que excedan significativamente la CMB del microorganismo durante la totalidad del intervalo y que este último debe ajustarse basándose en la vida media sérica de eliminación y en la dosis administrada.

### 2. Glucopéptidos

En un esfuerzo para hallar los factores que podrían contribuir a los fallos terapéuticos de la teicoplanina en el tratamiento de la endocarditis en humanos, Chambers et al<sup>125</sup> estudiaron la importancia de la dosis y de los valores pico y valle séricos en el tratamiento de la endocarditis experimental por *S. sanguis*. Hallaron que a pesar de que las concentraciones séricas de teicoplanina superaban varios cientos de veces la CMI del microorganismo infectante, el tratamiento con penicilina esterilizaba más rápidamente las vegetaciones. También se observó que una pauta i.v. de teicoplanina con un pico muy alto pero con un valle muy bajo era menos eficaz que la misma dosis administrada i.m. en la que el valle era mayor y el pico menor. Estos resultados les llevaron a considerar que, probablemente, para que teicoplanina fuera eficaz era necesaria una concentración sérica por encima de la CMI durante un intervalo de tiempo importante más que unos valores pico muy elevados durante poco tiempo.

Resultados similares fueron descritos por Contrepolis et al<sup>183</sup>, quienes compararon la vancomicina y la teicoplanina en el modelo de endocarditis estafilocócica en conejos. Comprobaron que para que la eficacia de teicoplanina fuera similar a la de vancomicina, la teicoplanina debía ser administrada cada 16 h, que era el mismo múltiplo de  $t_{1/2\beta}$  que correspondía a la pauta de dos veces al día de vancomicina. Estos resultados sugieren que el intervalo entre las dosis de teicoplanina es el mayor determinante de su eficacia *in vivo*. También demuestra que para la comparación de dos fármacos del mismo grupo, el intervalo de dosificación debe ser determinado sobre sus respectivos  $t_{1/2\beta}$ .

### 3. Quinolonas

Ingerman et al<sup>184</sup> compararon la eficacia de ciprofloxacino y de dos betalactámicos (BMY 28142 y ceftazidima) en el modelo de endocarditis experimental por *P. aeruginosa*. En los estudios *in vitro* se pudo observar que los betalactámicos tenían una velocidad de letalidad muy lenta y que no presentaban efecto postantibiótico (EPA)

ante el microorganismo infectante. Por este motivo, *in vivo*, debieron ser administrados en dosis múltiples y con intervalos de dosificación relativamente cortos para conseguir que sus valores estuvieran el mayor tiempo posible por encima de la CMB del microorganismo infectante. En cambio, el ciprofloxacino, debido a su rápida velocidad de letalidad y a la inducción de un EPA muy significativo, pudo administrarse de manera eficaz en dosis más elevadas a intervalos menos frecuentes.

Contrepolis et al<sup>185</sup> compararon la eficacia del tratamiento con feroxacina o ciprofloxacino de la endocarditis experimental por *E. coli* en conejos. La susceptibilidad antibiótica del microorganismo infectante y el patrón farmacocinético en conejos fue similar para los dos antimicrobianos:  $T_{1/2\beta}$ : 0,75 h). Para la misma dosis unitaria las concentraciones plasmáticas de feroxacina (9,5 mg/l) duplicaron las de ciprofloxacino (4,7 mg/l). La eficacia de feroxacina fue superior a la de ciprofloxacino administrados ambos cada 12 h durante 4 días en el tratamiento de la endocarditis experimental por *E. coli*.

Estos resultados podrían sugerir que las quinolonas tienen un efecto dosis-dependiente.

### Combinaciones antibióticas de betalactámicos y aminoglucósidos

El papel del intervalo de dosificación de los aminoglucósidos, y en concreto la posibilidad de su administración una vez al día, en las pautas de betalactámicos más aminoglucósidos ha sido investigado en el modelo animal de endocarditis por estreptococos del grupo *viridans*, enterococos y *E. coli*.

En el modelo de endocarditis por *E. coli*, Fantin et al demostraron sinergia *in vivo* de la combinación de ceftriaxona y netilmicina administradas una sola vez al día a dosis (15 mg/kg y 6 mg/kg, respectivamente) que eran poco eficaces cuando estos antibióticos eran administrados por separado. Este efecto se asoció con un aumento muy significativo del PBS valle con la combinación (1/8 con la combinación frente a 1/2 y menos de 1/2 con ceftriaxona y netilmicina, respectivamente)<sup>186</sup>.

Los mismos autores del trabajo anterior, Fantin y Carbon<sup>187</sup>, en el modelo de endocarditis experimental por *E. faecalis*, demostraron que la combinación de penicilina más netilmicina 12 mg/kg/día administrada tres veces al día era más eficaz que la misma combinación con netilmicina administrada una vez al día. Así mismo, penicilina más netilmicina en administración

fraccionada fue la única pauta que indujo una actividad bactericida del suero en el valle significativa. Estos autores concluyeron que eran necesarias concentraciones plasmáticas de aminoglicósido durante un tiempo prolongado para que la combinación betalactámico-aminoglicósido fuera eficaz en el modelo de endocarditis experimental por *E. faecalis*. Esta observación ha sido contestada posteriormente por Gavaldà et al<sup>188</sup>, quienes demostraron que la eficacia de la gentamicina administrada una vez al día era idéntica a su administración fraccionada. En este estudio se utilizó la técnica de la farmacocinética humanizada para la administración de ampicilina, por lo que los animales eran tratados con dosis para conseguir un perfil sérico idéntico al de los humanos tras la administración de 2 g cada 4 h.

Existen cinco trabajos relacionados con este tema en el modelo de endocarditis experimental por estreptococos del grupo *viridans*. Blatter et al<sup>189</sup> utilizaron 2 cepas de *S. sanguis*: una altamente sensible a ceftriaxona (CMI 0,032 µg/ml) y otra resistente a penicilina y con una CMI algo mayor a ceftriaxona (CMI penicilina-ceftriaxona [µg/ml] 2-2). La combinación de ceftriaxona más netilmicina (18 mg/kg) administradas una vez al día fue más eficaz que la administración de ambos antibióticos por separado. Estos resultados fueron válidos para los animales infectados tanto por la cepa sensible como por la resistente a penicilina. El grupo de Wilson<sup>190</sup> estudió la eficacia de gentamicina administrada una vez al día junto con ceftriaxona o penicilina en el tratamiento de la endocarditis experimental por estreptococos del grupo *viridans* sensibles a penicilina. Las combinaciones con 3 mg/kg de gentamicina administrada una o tres veces al día fueron igualmente eficaces. Las combinaciones de 25 mg/kg de ceftriaxona y de 3 mg/kg de gentamicina administradas ambas una vez al día fueron menos eficaces que la pauta estándar de penicilina y gentamicina (1 mg/kg) tres veces al día. Estos autores consideran que probablemente las diferencias en la eficacia de las pautas de ceftriaxona o penicilina podrían deberse a diferencias farmacocinéticas entre estos dos antibióticos. Chambers et al<sup>191</sup>, en un estudio muy parecido al anterior, hallaron los mismos resultados. Sin embargo, a diferencia del anterior, destaca que no encontraron diferencias entre las pautas de gentamicina en administración en una sola dosis al día y su administración fraccionada cada 8 h junto con ceftriaxona o penicilina. En el estudio del grupo de Carbon<sup>192</sup>, en el que comparan la eficacia de tres regímenes de tobramicina sola o

combinada con penicilina en el modelo de endocarditis experimental por estreptococos del grupo *viridans* nutricional-deficientes, los animales fueron tratados durante 4 días con 1 o 4 mg/kg de tobramicina administrada cada 8 h y 12 mg/kg una vez al día, tanto sola como combinada con penicilina. La eficacia de las tres pautas de penicilina y tobramicina fue parecida. Por tanto, no fue necesario obtener valores de aminoglicósido mantenidos durante todo el intervalo de dosificación para conseguir un efecto bactericida *in vivo* con penicilina y tobramicina ante estreptococos nutricional-deficientes. Finalmente, el grupo de Pahissa<sup>193</sup> realizó un estudio evaluando la eficacia de la administración de gentamicina una vez al día frente a su administración fraccionada tres veces al día en el tratamiento de la endocarditis experimental producida por cuatro cepas diferentes de estreptococos del grupo *viridans*, una sensible, una tolerante y dos resistentes a penicilina. Demostraron que el intervalo de dosificación de la gentamicina no tenía ninguna influencia en la eficacia terapéutica de la combinación y que la dosis mínima que se debía administrar una vez al día era de 3 mg/kg, ya que a dosis de 1 mg/kg la eficacia era inferior que la administración fraccionada.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Hamburger M, Garancis JC, Scott NJ, Carleton J, Beasley JS. Studies in experimental staphylococcal endocarditis in dogs V. Treatment with oxacillin. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 786-799.
2. Walker WF, Hamburger M. A study of experimental endocarditis in dogs I. Production of the disease, its natural history and tissue bacteriology. *J Lab Clin Med* 1959; 53: 931-941.
3. Walker WF, Hamburger M, Clark KL, Carleton J. Study of experimental staphylococcal endocarditis in dogs III. Effects of tetracycline dosage upon eradication of staphylococci from tissues and upon development of tetracycline resistant staphylococci. *J Lab Clin Med* 1961; 59: 481-489.
4. Keys TF, Sapico FL, Touchan R, Barenfus M, Hewitt WL. Experimental enterococcal endocarditis. I. Description of a canine model. *Am J Med Sci* 1972; 263: 103-109.
5. Sapico FL, Keys TF, Hewitt WL. Experimental enterococcal endocarditis. II. Study of *in vivo* synergism of penicillin and streptomycin. *Am J Med Sci* 1972; 263: 128-135.
6. Garrison PK, Freedman LR. Experimental endocarditis I. Staphylococcal endocarditis in rabbits resulting from placement of a polyethylene catheter in right side of the heart. *Yale J Biol Med* 1970; 42: 394-410.
7. Perlman BB, Freedman LR. Experimental endocarditis II. Staphylococcal infection of the aortic

- valve following placement of a polyethylene catheter in the left side of the heart. *Yale J Biol Med* 1971; 44: 206-213.
8. Perlman BB, Freedman LR. Experimental endocarditis III: Natural history of catheter induced staphylococcal endocarditis following catheter removal. *Yale J Biol Med* 1971; 44: 214-224.
  9. Sande MA, Irving RG. Penicillin-aminoglycoside in experimental *Streptococcus viridans* endocarditis. *J Infect Dis* 1974; 129: 572-576.
  10. Durack DT, Beeson PB. Experimental bacterial endocarditis I: colonisation of a sterile vegetation. *Br J Exp Pathol* 1972; 53: 44-49.
  11. Durack DT, Beeson PB, Petresdorf RG. Experimental bacterial endocarditis II: survival of bacteria in endocardial vegetation. *Br J Exp Pathol* 1972; 53: 50-53.
  12. Durack DT, Beeson PB, Petersdorf RG. Experimental bacterial endocarditis III: production and progress of the disease in rabbits. *Br J Exp Pathol* 1973; 54: 142-151.
  13. Durack DT. Experimental bacterial endocarditis IV: structure and evolution of very early lesions. *J Pathol* 1975; 115: 81-89.
  14. Gutschik E. Experimental endocarditis in rabbits 6. Results of long-term combined therapy of *Streptococcus faecalis* endocarditis with penicillin and streptomycin. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]* 1982; 90: 37-47.
  15. Gutschik E, Christensen N. Experimental endocarditis in rabbits 1. Techniques and spontaneous course of non-bacterial thrombotic endocarditis. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]* 1978; 86: 215-221.
  16. Gutschik E, Christensen N. Experimental endocarditis in rabbits 2. Course of untreated *Streptococcus faecalis* infection. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]* 1978; 86: 223-228.
  17. Gutschik E, Norwood RS, Moller S, Olling S. Experimental endocarditis in rabbits 3. Significance of the proteolytic capacity of infecting strains of *Streptococcus faecalis*. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]* 1979; 87: 353-362.
  18. Gutschik E, Norwood RS, Moller S, Olling S. Experimental endocarditis in rabbits 4. Experiments with *Serratia marcescens*: on the significance of serum susceptibility and proteolytic capacity of the strains and the influence of indwelling catheter. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]* 1980; 88: 269-276.
  19. Gutschik E, Mortensen I, Moller S. Experimental endocarditis in rabbits 5. Results of long-term penicillin or streptomycin therapy and the effect of long term exposure of healthy rabbits to the same drugs. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]* 1982; 90: 25-35.
  20. Gutschik E, Mortensen I, Moller S. Experimental endocarditis in rabbits 7. Results of log-term combined therapy of *Streptococcus faecalis* endocarditis with penicillin and gentamicin. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]* 1982; 90: 295-302.
  21. Santoro J, Levison ME. Rat model of experimental endocarditis. *Infect Immun* 1978; 19: 915-918.
  22. Heraief E, Glauser MP, Freedman LR. Natural history of aortic valve endocarditis in rats. *Infect Immun* 1982; 37: 127-131.
  23. Imataka K, Kitahara Y, Fujii J. Production of experimental infective endocarditis in rabbit mitral valve prolapse induced by vagus stimulation. *J Cardiol* 1989; 18 (Supl): 57-63.
  24. Imataka K, Kitahara Y. Experimental production of mitral valve and papillary muscle lesions by cervical vagus stimulation in rabbits. *J Cardiol* 1987; 14 (Supl): 21-36.
  25. Overholser CD, Moreillon P, Glauser MP. Experimental bacterial endocarditis after dental extractions in rats with periodontitis. *J Infect Dis* 1987; 155: 107-112.
  26. Overholser CD, Moreillon P, Glauser MP. Experimental endocarditis following dental extractions in rats with periodontitis. *J Oral Maxillofac Surg* 1988; 46: 857-861.
  27. Grogan EL, Sande MA, Clark RE, Nolan SP. Experimental endocarditis in calf after tricuspid valve replacement. *Ann Thorac Surg* 1980; 30: 64-69.
  - 27a. Lefort A, Fantin B. Rabbit model of bacterial endocarditis. En: Zak O, Sande MA, editores. *Handbook of Animal Models of Infection*. San Diego: Academic Press, 1999; 257-283.
  28. Enzler MJ, Rouse MS, Henry NK, Geraci JE, Wilson WR. *In vitro* and *in vivo* studies of streptomycin-resistant, penicillin-susceptible streptococci from patients with infective endocarditis. *J Infect Dis* 1987; 155: 954-958.
  29. Rouse MS, Wilcox RM, Henry NK, Steckelberg JM, Wilson WR. Ciprofloxacin therapy of experimental endocarditis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 273-276.
  30. Drake TA, Rodgers GM, Sande MA. Tissue factor is a major stimulus for vegetation formation in enterococcal endocarditis in rabbits. *J Clin Invest* 1984; 73: 1.750-1.753.
  31. Freedman LR, Valone J Jr. Experimental infective endocarditis. *Prog Cardiovasc Dis* 1979; 22: 169-180.
  32. Pujadas-Capmany R, Permanyer-Miralda G, Foz-Sala M, Argimon-Pallas J, Rosell-Albaurrea F, Jane-Pesques J et al. Reduction of the susceptibility to infective endocarditis with time in animals with endocavitary catheters. *Br J Exp Pathol* 1984; 65: 683-690.
  33. Korzeniowski M, Wennersten C, Moellering RC Jr, Sande MA. Penicillin-netilmicin synergism against *Streptococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1978; 13: 430-434.
  34. Bayer AS, Norman DC. Valve site-specific pathogenetic differences between right-sided and left-sided bacterial endocarditis. *Chest* 1990; 98: 200-205.
  35. Bayer AS, Norman D, Kim KS. Efficacy of amikacin and ceftazidime in experimental aortic valve endocarditis due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28: 781-785.
  36. Carrizosa J, Kaye D. Antibiotic synergism in enterococcal endocarditis. *J Lab Clin Med* 1976; 88: 132-141.

37. Francioli P, Freedman LR. Streptococcal infection of endocardial and other intravascular vegetations in rabbits: natural history and effect of dexamethasone. *Infect Immun* 1979; 24: 483-491.
38. Glauser MP, Francioli P. Successful prophylaxis against experimental streptococcal endocarditis with bacteriostatic antibiotics. *J Infect Dis* 1982; 146: 806-810.
39. Glauser MP, Bernard JP, Moreillon P, Francioli P. Successful single-dose amoxicillin prophylaxis against experimental streptococcal endocarditis: evidence for two mechanisms of protection. *J Infect Dis* 1983; 147: 568-575.
40. Francioli P, Moreillon P, Glauser MP. Comparison of single doses of amoxicillin or of amoxicillin-gentamicin for the prevention of endocarditis caused by *Streptococcus faecalis* and by viridans streptococci. *J Infect Dis* 1985; 152: 83-89.
41. Durack DT, Petersdorf RG. Chemotherapy of experimental streptococcal endocarditis I. Comparison of commonly recommended prophylactic regimens. *J Clin Invest* 1973; 52: 592-598.
42. Pelletier LL, Petersdorf RG. Chemotherapy of experimental streptococcal endocarditis. V. Effect of duration of infection and retained intracardiac catheter on response to treatment. *J Lab Clin Med* 1976; 87: 692-702.
43. Southwick FS, Durack DT. Chemotherapy of experimental streptococcal endocarditis. III. Failure of a bacteriostatic agent (teracycline) in prophylaxis. *J Clin Pathol* 1974; 27: 261-264.
44. Durack DT, Pelletier LL, Petersdorf RG. Chemotherapy of experimental streptococcal endocarditis. II. Synergism between penicillin and streptomycin against penicillin-sensitive streptococci. *J Clin Invest* 1974; 53: 829-833.
45. Durack DT, Stakerbaum MK, Petersdorf RG. Chemotherapy of experimental streptococcal endocarditis. VI. Prevention of enterococcal endocarditis. *J Lab Clin Med* 1977; 90: 171-179.
46. Bernard JP, Francioli P, Glauser MP. Vancomycin prophylaxis of experimental *Streptococcus sanguis* endocarditis. Inhibition of bacterial adherence rather than bacterial killing. *J Clin Invest* 1981; 68: 1.113-1.116.
47. Francioli P, Glauser MP. Successful prophylaxis of experimental streptococcal endocarditis with single doses of sublethal concentrations of penicillin. *J Antimicrob Chemother* 1985; 15 (Supl A): 297-302.
48. Pujadas R, Escrivá E, Jane J, Argimon J, Fernández F, Fava P et al. Tolerance and efficacy of parenterally administered penicillin-streptomycin and orally administered amoxicillin or penicillin V for prophylaxis of experimentally induced streptococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 321-325.
49. Berney P, Francioli P. Successful prophylaxis of experimental streptococcal endocarditis with single-dose amoxicillin administered after bacterial challenge. *J Infect Dis* 1990; 161: 281-285.
50. Pujadas R, Escrivá E, Jané J, Galera MC, Fava P, Garan J, Mirelis B et al. Efficacy of orally administered penicillin V for prophylaxis of experimentally induced streptococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 1.474-1.477.
51. Malinverni R, Francioli PB, Glauser MP. Comparison of single and multiple doses of prophylactic antibiotics in experimental streptococcal endocarditis. *Circulation* 1987; 76: 376-382.
52. Francioli P, Glauser MP. Successful prophylaxis of experimental streptococcal endocarditis with single doses of sublethal concentrations of penicillin. *J Antimicrob Chemother* 1985; 15 (Supl A): 297-302.
53. Scheld WM, Zak O, Vosbeck K, Sande MA. Bacterial adherence in the pathogenesis of infective endocarditis. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on streptococcal adhesion *in vivo* and the development of endocarditis in rabbits. *J Clin Invest* 1981; 68: 1.381-1.384.
- 53a. Rouse MS, Steckelberg JM, Brandt CM, Patel R, Miró JM, Wilson WR. Efficacy of azithromycin or clarithromycin for prophylaxis of *viridans* group streptococcus experimental endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1.673-1.676.
- 53b. Blatter M, Francioli P. Endocarditis prophylaxis: from experimental models to human recommendation. *Eur Heart J* 1995; 16 (Supl B): 107-109.
54. Telenti Asensio A, Telenti Rodríguez A, Wilson WR. Endocarditis infecciosa. En: Perea EJ, editor. *Enfermedades infecciosas*. Barcelona: Doyma, 1991; 288-309.
55. Miró JM, Marco F, García C, Plana D, Soy D, Brunet M et al. Efficacy of the current recommended prophylactic antibiotics for preventing penicillin-resistant glycopeptides-tolerant *viridans* streptococci experimental endocarditis [resumen B-19]. En: Abstracts of the 37<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Toronto (Canada), September 28-October 1, 1997. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1997.
56. Berney P, Francioli P. Successful prophylaxis of experimental streptococcal endocarditis with single-dose amoxicillin administered after bacterial challenge. *J Infect Dis* 1990; 161: 281-285.
57. James J, MacFarlane TW, McGowan DA, MacKenzie D. Failure of post-bacteraemia delayed antibiotic prophylaxis of experimental rabbit endocarditis. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20: 883-885.
58. Petersdorf RG. Antimicrobial prophylaxis of bacterial endocarditis, prudent caution or bacterial overkill? *Am J Med* 1978; 65: 220-223.
59. Carrizosa J, Kobasa WD, Kaye D. Antagonism between chloramphenicol and penicillin in streptococcal endocarditis in rabbits. *J Lab Clin Med* 1975a; 85: 307-311.
60. Carrizosa J, Kaye D. Antibiotic concentrations in serum, serum bactericidal activity, and results of therapy of streptococcal endocarditis in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother* 1977; 12: 479-483.
61. Carrizosa J, Kobasa WD, Kaye D. Comparison of ceforanide, cefazolin, methicillin, and nafcillin in *Staphylococcus aureus* endocarditis therapy in rab-

- bits. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 18: 562-565.
62. Korzeniowski M, Wennersten C, Moellering RC Jr, Sande MA. Penicillin-netilmicin synergism against *Streptococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1978; 13: 430-434.
  63. Wolfson JS, Swartz MN. Serum bactericidal activity as a monitor of antibiotic therapy. *N Engl J Med* 1985; 312: 968-975.
  64. Coleman DL, Horwitz RI, Andriole VT. Association between serum inhibitory and bactericidal concentrations and therapeutic outcome in bacterial endocarditis. *Am J Med* 1982; 73: 260-267.
  65. Weinstein MP, Strraton CW, Ackley A, Hawley HB, Robinson PA, Fisher BD et al. Multicenter collaborative evaluation of a standardized serum bactericidal test as a prognostic indicator in infective endocarditis. *Am J Med* 1985; 78: 262-269.
  66. Lorian V, Zak O, Vaxelaire J. Staphylococcal endocarditis in rabbits treated with a low dose of cloxacillin. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 25: 311-315.
  67. Cremieux AC, Maziere B, Vallois JM, Ottaviani M, Azancot A, Raffool H et al. Evaluation of antibiotic diffusion into cardiac vegetations by quantitative autoradiography. *J Infect Dis* 1989; 159: 938-944.
  68. Karchmer AW, Moellering RC Jr, Maki DG, Swartz MN. Single-antibiotic therapy of streptococcal endocarditis. *JAMA* 1979; 241: 1.801-1.806.
  69. Carey RB, Brause BD, Roberts RB. Antimicrobial therapy of vitamin B<sub>6</sub>-dependent streptococcal endocarditis. *Ann Intern Med* 1977; 87: 150-154.
  70. Hess J, Dankert J, Durack DT. Significance of penicillin tolerance in vivo: prevention of experimental *Streptococcus sanguis* endocarditis. *J Antimicrob Chemother* 1983; 11: 1-7.
  71. Pulliam LS, Inokuchi S, Hadley WK, Mills J. Penicillin tolerance in experimental endocarditis. *Lancet* 1979; 2: 957.
  72. Wilson WR, Zak O, Sande MA. Penicillin therapy for treatment of experimental endocarditis caused by *viridans* streptococci in animals. *J Infect Dis* 1985; 151: 1.028-1.033.
  73. Brennan RO, Durack DT. Therapeutic significance of penicillin tolerance in experimental streptococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 23: 273-277.
  74. Lowy FD, Neuhaus EG, Chang DS, Steigbigel NH. Penicillin therapy of experimental endocarditis induced by tolerant *Streptococcus sanguis* and nontolerant *Streptococcus mitis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 23: 67-73.
  75. Van de Rijn I. Role of culture conditions and immunization in experimental nutritionally variants streptococcal endocarditis. *Infect Immun* 1985; 50: 641-646.
  76. Bouvet A, Cremieux AC, Contrepolis A, Vallais JM, Lamesch C, Carbon C et al. Comparison of penicillin and vancomycin, individually and in combination with gentamicin and amikacin, in the treatment of experimental endocarditis induced by nutritionally variant streptococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28: 607-611.
  77. Henry NK, Wilson WR, Roberts RB, Acar JF, Geraci JE. Antimicrobial therapy of experimental endocarditis caused by nutritionally variant *viridans* group streptococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 30: 465-467.
  78. Entenza JM, Vouillamoz J, Glauser MP, Moreillon P. Efficacy of trovafloxacin in treatment of experimental staphylococcal or streptococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 77-84.
  79. Wilson WR, Thompson RL, Wilkowskwe CJ, Washington JA, Giuliani ER, Geraci JE et al. Short-term therapy for streptococcal infective endocarditis: combined intramuscular administration of penicillin and streptomycin. *JAMA* 1981; 245: 360-363.
  80. Pérez JL, Riera L, Valls F, Berrocal CI, Berrocal L. A Comparison of the in vitro activity of seventeen antibiotics against *Streptococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20: 357-362.
  81. Tofte RW, Solliday J, Crossley KB. Susceptibilities of enterococci to twelve antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 25: 532-533.
  82. Carrizosa J, Levison ME. Minimal concentrations of aminoglycoside that can synergize with penicillin in enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1981; 20: 405-409.
  83. Hook EW III, Roberts RR, Sande MA. Antimicrobial therapy of experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1975; 8: 564-570.
  84. Calderwood SB, Wennersten C, Moellering RC Jr, Kuntz LJ, Krogstad DJ. Resistance to six aminoglycosidic aminocyclitol antibiotics among enterococci: prevalence, evolutions, and relationship to synergism with penicillin. *Antimicrob Agents Chemother* 1977; 12: 401-405.
  85. Hindes RG, Willey SH, Eliopoulos GM, Rice LB, Eliopoulos CT, Murray BE et al. Treatment of experimental endocarditis caused by a beta-lactamase-producing strain of *Enterococcus faecalis* with high-level resistance to gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 1.019-1.022.
  86. Moellering RC Jr, Wennersten C, Medrek T, Weinberg AN. Prevalence of high-level resistance to aminoglycosides in clinical isolates of enterococci. *En: Antimicrobial Agents and Chemotherapy-1970*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1970; 10: 334-340.
  87. Sande MA, Scheld WM. Combination antibiotic therapy of bacterial endocarditis. *Ann Intern Med* 1980; 92: 390-395.
  88. Sullam PM, Tauber MG, Hackbarth CJ, Sande MA. Antimicrobial activity of gentamicin in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 27: 224-226.
  89. Mandell GL, Kaye D, Levison ME, Hook EW. Enterococcal endocarditis: an analysis of 38 patients observed at the New York Hospital-Cornell Medical Center. *Arch Intern Med* 1970; 125: 258-264.
  90. Matsumoto JY, Wilson WR, Wright AJ, Geraci JE, Washington JA II. Synergy of penicillin and decreasing concentrations of aminoglycosides against enterococci from patients with infective endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 18: 944-947.



91. Henry NK, Wilson WR, Geraci JE. Treatment of streptomycin-susceptible enterococcal experimental endocarditis with combination of penicillin and low- or high- dose streptomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 30: 725-728.
92. Tight RR. Ampicillin therapy of experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 18: 307-310.
93. Sullam PM, Tauber MG, Hackbarth CJ, Sande MA. Therapeutic efficacy of teicoplanin in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 27: 135-136.
94. Yao JD, Thauvin-Eliopoulos C, Eliopoulos GM, Moellering RC Jr. Efficacy of teicoplanin in two dosage regimens for experimental endocarditis caused by a beta-lactamase-producing strain of *Enterococcus faecalis* with high-level resistance to gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 827-830.
95. Bush LM, Boscia JA, Kaye D. Daptomycin (LY146032) treatment of experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 877-881.
96. Lincoln LJ, Weinstein AJ, Gallaher M, Abrutyn E. Penicillinase resistant penicillins plus gentamicin in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1977; 12: 484-489.
97. Abrutyn E, Lincoln L, Gallagher M, Weinstein AJ. Cephalothin-gentamicin synergism in experimental enterococcal endocarditis. *J Antimicrob Chemother* 1978; 4: 153-158.
98. Scheld WM, Keeley JM. Imipenem therapy of experimental *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus faecalis* endocarditis. *J Antimicrob Chemother* 1983; 12 (Supl D): 65-78.
99. Auckenthaler R, Wilson WR, Wright AJ, Washington II J, Durack DT, Geraci JE. Lack of *in vivo* and *in vitro* bactericidal activity of N-formimidoyl-thienamycin against enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 22: 448-452.
100. Fernández-Guerrero M, Rouse MS, Henry NK, Geraci JE, Wilson WR. *In vitro* and *in vivo* activity of ciprofloxacin against enterococci isolated from patients with infective endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 430-433.
101. Grayson ML, Thauvin-Eliopoulos C, Eliopoulos GM, Yao JD, De Angelis DV, Walton L et al. Failure of trimethoprim-sulfamethoxazole therapy in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 1.792-1.794.
102. Fass RJ, Wright CA. Comparative efficacies of mezlocillin and ampicillin alone or in combination with gentamicin in the treatment of *Streptococcus faecalis* endocarditis in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 25: 408-410.
103. Murray BE, Church DA, Wanger A, Zscheck K, Levison ME, Ingerman MJ et al. Comparison of two  $\beta$ -lactamase-producing strains of *Streptococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 30: 861-864.
104. Ingerman M, Pitsakis PG, Rosenberg A, Hessen MT, Abrutyn E, Murray BE et al. Beta-Lactamase production in experimental endocarditis due to aminoglycoside-resistant *Streptococcus faecalis*. *J Infect Dis* 1987; 155: 1.226-1.232.
105. Wilson WR, Wilkowske CJ, Wright AJ, Sande MA, Geraci JE. Treatment of streptomycin-susceptible and resistant enterococcal endocarditis. *Ann Intern Med* 1984; 100: 816-823.
106. Mederski-Samoraj BD, Murray BE. High-level resistance to gentamicin in clinical isolates of enterococci. *J Infect Dis* 1983; 147: 751-757.
107. Thauvin C, Eliopoulos GM, Willey S, Wennersten C, Moellering RC Jr. Continuous-infusion ampicillin therapy of enterococcal endocarditis in rats. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 139-143.
108. Hellinger WC, Rouse MS, Rabadan PM, Henry NK, Stickelberg JM, Wilson WR et al. Continuous intravenous vs. intermittent ampicillin therapy of experimental endocarditis caused by aminoglycoside-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1.272-1.275.
109. Scheld WM, Keeley JM. Imipenem therapy of experimental *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus faecalis* endocarditis. *J Antimicrob Chemother* 1983; 12 (Supl D): 65-78.
110. Smith SM, Eng RHK. Interaction of ciprofloxacin with ampicillin and vancomycin for *Streptococcus faecalis*. *Diag Microbiol Infect Dis* 1988; 9: 239-243.
111. Rice LB, Eliopoulos GM, Moellering RC Jr. *In vitro* synergism between daptomycin and fosfomycin against high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 470-473.
112. Wanger AR, Murray BE. Activity of LY146032 against enterococci with and without high-level aminoglycoside resistance, including two penicillinase-producing strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 1.779-1.781.
113. Gavalda J, Torres C, Tenorio C, López P, Zaragoza M, Capdevila JA et al. Efficacy of ampicillin plus ceftriaxone in treatment of experimental endocarditis due to *Enterococcus faecalis* strains highly resistant to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 639-646.
114. Landman D, Quale JM, Mobarakai N, Zaman MM. Ampicillin plus ciprofloxacin therapy of experimental endocarditis caused by multidrug-resistant *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother* 1995; 36: 253-258.
115. Landman D, Quale JM, Burney S, Kreiswirth B, Willey BMJ. Treatment of experimental endocarditis caused by multidrug resistant *Enterococcus faecium* with ramoplanin and penicillin. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 37: 323-329.
116. Zaman MM, Landman D, Burney S, Quale JM. Treatment of experimental endocarditis due to multidrug-resistant *Enterococcus faecium* with ciprofloxacin and penicillin. *J Antimicrob Chemother* 1996; 37: 127-132.
117. Brandt CM, Rouse MS, Laue NW, Stratton CW, Wilson WR, Steckelberg JM. Effective treatment of

- multidrug-resistant enterococcal experimental endocarditis with combinations of cell wall-active agents. *J Infect Dis* 1996; 173: 909-913.
118. Caron F, Lemeland JF, Humbert G, Klare I, Gutmann L. Triple combination penicillin-vancomycin-gentamicin for experimental endocarditis caused by a highly penicillin-and glycopeptide-resistant isolate of *Enterococcus faecium*. *J Infect Dis* 1993; 168: 681-686.
  119. Caron F, Pestel M, Kitzis MD, Lemeland JF, Humbert G, Gutmann L. Comparison of different beta-lactam-glycopeptide-gentamicin combinations for an experimental endocarditis caused by a highly beta-lactam-resistant and highly glycopeptide-resistant isolate of *Enterococcus faecium*. *J Infect Dis* 1995; 171: 106-112.
  - 119a. Miró JM, Gatell JM, Pujadas R, Escriba E, Arguiron J, Fava P, Jane J et al. Right-sided endocarditis with *Staphylococcus aureus*. *Ann Intern Med* 1989; 110: 497-498.
  120. Sande MA, Johnson JL. Antimicrobial therapy of experimental endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 1975; 131: 367-376.
  121. Fernández-Guerrero M, Rouse M, Henry N, Wilson W. Ciprofloxacin therapy of experimental endocarditis caused by methicillin-susceptible or methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 747-751.
  122. Steckelberg JM, Rouse MS, Tallan BM, Osmon DR, Henry NK, Wilson WR. Relative efficacies of broad-spectrum cephalosporins for treatment of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* experimental infective endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 554-558.
  123. Chambers HF, Sande MA. Teicoplanin versus nafcillin and vancomycin in the treatment of experimental endocarditis caused by methicillin-susceptible or -resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 26: 61-64.
  124. Kaatz GW, Seo SM, Reddy VN, Bailey EM, Rybak MJ. Daptomycin compared with teicoplanin and vancomycin for therapy of experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 2.081-2.085.
  125. Chambers HF, Kennedy S. Effects of dosage, peak and trough concentrations in serum, protein binding, and bactericidal rate on efficacy of teicoplanin in a rabbit model of endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 510-514.
  126. Bush M, Boscia JA, Wendeler M, Pistakis PG, Kaye D. *In vitro* postantibiotic effect of Daptomycin (LY146032) against *Enterococcus faecalis* and methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 1.198-1.200.
  127. Cantoni L, Glauser MP, Bille J. Comparative efficacy of daptomycin, vancomycin, and cloxacillin for the treatment of *Staphylococcus aureus* endocarditis in rats and role of test conditions in this determination. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 2.348-2.353.
  128. Kennedy S, Chambers HF. Daptomycin (LY146032) for prevention and treatment of experimental aortic valve endocarditis in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 1.522-1.525.
  129. Chandrasekar PH, Levine DP, Price S, Rybak MJ. Comparative efficacies of imipenem-cilastatin and vancomycin in experimental aortic valve endocarditis due to methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1988; 21: 461-469.
  130. Baumgartner JD, Glauser MP. Comparative imipenem treatment of *Staphylococcus aureus* endocarditis in the rat. *J Antimicrob Chemother* 1983; 12 (Supl D): 79-87.
  131. Catherall EJ, Gillon V, Hurn S, Irwin R, Mizen L. Efficacy of ticarcillin-clavulanic acid for treatment of experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis in rats. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 458-462.
  132. Scheld WM, Johnson ML, Gerhardt EB, Sande MA. Clindamycin therapy of experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 21: 646-649.
  133. Watanakunakorn C, Glotzbecker C. Enhancement of the effects of antistaphylococcal antibiotics by aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 1974; 6: 802-806.
  134. Sande MA, Courtney KB. Nafcillin-gentamicin synergism in experimental *Staphylococcus* endocarditis. *J Lab Clin Med* 1976; 88: 118-124.
  135. Miller MH, Wexler JA, Steigbigel NM. Single and combination antibiotic therapy of *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis: emergence of gentamicin resistant mutants. *Antimicrob Agents Chemother* 1978; 14: 336-343.
  136. Watanakunakorn C, Baird IM. Prognostic factors in *Staphylococcus aureus* endocarditis and results of therapy with penicillin and gentamicin. *Am J Med Sci* 1977; 273: 133-139.
  137. Abrams B, Sklaver A, Hoffman T, Greenman R. Single or combination therapy of staphylococcal endocarditis in intravenous drug abusers. *Ann Intern Med* 1979; 90: 789-791.
  138. Korzeniowski OM, Sande MA, The National Collaborative Endocarditis Study Group. Combinatorial antimicrobial therapy of *Staphylococcus aureus* endocarditis in parenteral drug addicts and nonaddicts: a prospective study. *Ann Intern Med* 1982; 97: 496-503.
  139. Hessen MT, Pitsakis PG, Kaye D. Oral temafloxacin versus vancomycin for therapy of experimental endocarditis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 1.143-1.145.
  140. Kaatz GW, Seo SM, Barriere SL, Albrecht LM, Rybak MJ. Efficacy of ofloxacin in experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 257-260.
  141. Kaatz GW, Seo SM, Barriere SL, Albrecht LM, Rybak MJ. Ciprofloxacin and rifampin, alone and in combination, for therapy of experimental

- Staphylococcus aureus* endocarditis. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33: 1.184-1.187.
142. Kaatz GW, Seo SM, Barriere SL, Albrecht LM, Rybak MJ. Efficacy of fleroxacin in experimental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33: 519-521.
  143. Boscia JA, Kobasa WD, Kaye D. Comparison of difloxacin, enoxacin, and cefazolin for the treatment of experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32: 262-264.
  144. Kaatz GW, Barriere SL, Schaberg DR, Fekety R. The emergence of resistance to ciprofloxacin during treatment of experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis. J Antimicrob Chemother 1987; 20: 753-758.
  145. Kaatz GW, Barriere SL, Schaberg DR, Fekety R. Ciprofloxacin versus vancomycin in the therapy of experimental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. Antimicrob Agents Chemother 1987; 31: 527-530.
  146. Carpenter TC, Hackbarth CJ, Chambers HF, Sande MA. Efficacy of ciprofloxacin for experimental endocarditis caused by methicillin-susceptible or -resistant strains of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1986; 30: 382-384.
  147. Gilbert M, Boscia JA, Kobasa WD, Kaye D. Enoxacin compared with vancomycin for the treatment of experimental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. Antimicrob Agents Chemother 1986; 29: 461-463.
  148. Sullam PM, Tauber MG, Hackbarth CJ, Chambers HF, Scott KG, Sande MA et al. Pefloxacin therapy for experimental endocarditis caused by methicillin-susceptible or methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1985; 27: 685-687.
  149. Kaatz GW, Seo SM, Barriere SL, Albrecht LM, Rybak MJ. Development of resistance to fleroxacin during therapy of experimental methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* endocarditis. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 1.547-1.550.
  150. Bayer AS, Li C, Ing M. Efficacy of trovafloxacin, a new quinolone antibiotic, in experimental staphylococcal endocarditis due to oxacillin-resistant strains. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 1.837-1.841.
  151. Entenza JM, Marchetti O, Glauser MP, Moreillon P. Y-688, a new quinolone active against quinolone-resistant *Staphylococcus aureus*: lack of *in vivo* efficacy in experimental endocarditis. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 1.889-1.894.
  152. Kaatz GW, Seo SM, Aeschlimann JR, Houlihan HH, Mercier RC, Rybak MJ. Efficacy of trovafloxacin against experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 254-260.
  153. Kaatz GW, Seo SM, Barriere SL, Albrecht LM, Rybak MJ. Development of resistance to fleroxacin during therapy of experimental methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* endocarditis. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 1.547-1.550.
  154. Chambers HF, Hackbarth CJ, Drake TA, Rusnak MG, Sande MA. Endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in rabbits: expression of resistance to beta-lactam antibiotics *in vivo* and *in vitro*. J Infect Dis 1984; 149: 894-903.
  155. Washburn RG, Durack DT. Efficacy of ampicillin plus a beta-lactamase inhibitor (CP-45,899) in experimental endocarditis due to *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis 1981; 144: 237-243.
  156. Hirano L, Bayer AS. Beta-Lactam-beta-lactamase-inhibitor combinations are active in experimental endocarditis caused by beta-lactamase-producing oxacillin-resistant staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 685-690.
  157. Catherall EJ, Irwin R, Mizen LW. Efficacy of amoxycillin/clavulanic acid in experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis in the rat. J Antimicrob Chemother 1991; 27: 117-126.
  158. Thauvin-Eliopoulos C, Rice LB, Eliopoulos GM, Moellering RC Jr. Efficacy of oxacillin and ampicillin-sulbactam combination in experimental endocarditis caused by beta-lactamase-hyperproducing *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34: 728-732.
  159. Cantoni L, Wenger A, Glauser MP, Bille J. Comparative efficacy of amoxicillin-clavulanate, cloxacillin, and vancomycin against methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis in rats. J Infect Dis 1989; 159: 989-993.
  160. Chambers HF, Sachdeva M, Kennedy S. Binding affinity for penicillin-binding protein 2a correlates with *in vivo* activity of beta-lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis 1990; 162: 705-710.
  161. Marco F, Miró JM, García C, Plana D, Espasa M, Dern E et al. Synergistic *in vitro* activity of fosfomicin and imipenem or ceftriaxones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (SARM) [resumen E-57]. En: Abstracts of the 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). San Diego. CA. September 24-27, 1998. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1998.
  162. De Górgolas M, Avilés P, Verdejo C, Fernández Guerrero ML. Treatment of experimental endocarditis due to methicillin-susceptible or methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with trimethoprim-sulfamethoxazole and antibiotics that inhibit cell wall synthesis. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 953-957.
  163. Miró JM, Marco F, García C, Gavaldà J, Del Río A, Dern E et al. Efficacy of fosfomicin (Fos) plus imipenem (Imi) combination in the treatment of experimental endocarditis (EE) due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (SARM) [resumen 1015]. En: Abstracts of the 39th Interscience Con-

- ference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). San Francisco. CA. September 26-29, 1999. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1999.
164. Entenza JM, Vouillamoz J, Glauser MP, Moreillon P. Levofloxacin versus ciprofloxacin, flucloxacillin, or vancomycin for treatment of experimental endocarditis due to methicillin-susceptible or -resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1.662-1.667.
  165. Kaatz GW, Seo SM, Aeschlimann JR, Houlihan HH, Mercier RC, Rybak MJ. Efficacy of LY333328 against experimental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 981-983.
  166. Perdikaris G, Giamarellou H, Pefanis A, Donta I, Karayiannakos P. Vancomycin or vancomycin plus netilmicin for methicillin- and gentamicin-resistant *Staphylococcus aureus* aortic valve experimental endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2.289-2.294.
  167. Chambers HF, Kartalija M, Sande MA. Ampicillin, sulbactam, and rifampin combination treatment of experimental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis in rabbits. *J Infect Dis* 1995; 171: 897-902.
  168. Fantin B, Leclercq R, Duval J, Carbon C. Fusidic acid alone or in combination with vancomycin for therapy of experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 2.466-2.469.
  169. Climo R, Patron RL, Archer G. Combinations of vancomycin and  $\beta$ -lactams are synergistic in the treatment of vancomycin intermediate susceptible *Staphylococcus aureus* (VISA) [resumen LB-8]. 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). San Diego, CA: September 24-27, 1998.
  170. Climo R, Patron RL, Hale-Cooper CG, Hanners E, Archer G. Vancomycin treatment of vancomycin intermediate-susceptible *Staphylococcus aureus* strains in the rabbit model of aortic valve endocarditis [resumen B-75]. 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). San Diego, CA: September 24-27, 1998.
  171. Archer GL. Antimicrobial susceptibility and selection of resistance among *Staphylococcus epidermidis* isolates recovered from patients with infections of indwelling foreign devices. *Antimicrob Agents Chemother* 1978; 14: 353-359.
  172. Laverdiere M, Peterson PK, Verhoef J, Williams DN, Sabath LD. *In vitro* activity of cephalosporins against methicillin-resistant, coagulase-negative staphylococci. *J Infect Dis* 1978; 137: 245-260.
  173. Archer J, Johnson JL, Vazquez GJ, Haywood HB III. Efficacy of antibiotic combinations combinations including rifampin against methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*: *in vitro* and *in vivo* studies. *Rev Infect Dis* 1983; 5 (Supl 3): 538-542.
  174. Vazquez GJ, Archer GL. Antibiotic therapy of experimental *Staphylococcus epidermidis* endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 17: 280-285.
  175. Lowy FP, Wexler MA, Steigbigel NH. Therapy of experimental methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* endocarditis. En: Nelson JD, Grassi C, editores. *Current chemotherapy and infectious disease*. Washington DC: American Society for Microbiology, 1980; 913-915.
  176. Gengo FM, Schentag JJ. Methicillin distribution in serum and extravascular fluid and its relevance to normal and damaged heart valves. *Antimicrob Agents Chemother* 1981; 19: 836-841.
  177. Gengo FM, Schentag JJ. Rate of methicillin penetration into normal heart valves and experimental endocarditis lesions. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 456-459.
  178. Contrepois A, Vallois JM, Garaud JJ, Pangon B, Mohler J, Meulemans A et al. Kinetics and bactericidal effect of gentamicin and latamoxef (moxalactam) in experimental *Escherichia coli* endocarditis. *J Antimicrob Chemother* 1986; 17: 227-237.
  179. Gengo FM, Mannion TW, Nightingale CH, Schentag JJ. Integration of pharmacokinetics and pharmacodynamics of methicillin in curative treatment of experimental endocarditis. *J Antimicrob Chemother* 1984; 14: 619-631.
  180. Cometta A, Moosman Y, francioli M, Bille J, Glauser MP. Absence of correlation between increasing penicillin G correlations and efficacy in the treatment of streptococcal aortic valve rat endocarditis [resumen 366]. En: *Programs and Abstracts of the 28th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1988*, American Society for Microbiology, Los Angeles.
  181. Joly V, Pangon B, Vallois JM, Abel L, Brion N, Buke A et al. Value of antibiotic levels in serum and cardiac vegetations for predicting antibacterial effect of ceftriaxone in experimental *Escherichia coli* endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 518-522.
  182. Cremieux AC, Maziere B, Vallois JM, Ottaviani M, Bouvet A, Pocardalo JJ et al. Ceftriaxone diffusion into cardiac fibrin vegetation. Qualitative and quantitative evaluation by autoradiography. *Fundam Clin Pharmacol* 1991; 5: 53-60.
  183. Contrepois A, Joly V, Abel L, Pangon B, Vallais JM, Carbon C et al. The pharmacokinetics and extravascular diffusion of teicoplanin in rabbits and comparative efficacy with vancomycin in an experimental endocarditis model. *J Antimicrob Chemother* 1988; 21: 621-631.
  184. Ingberman MJ, Pitsakis PG, Rosenberg AF, Levison ME. The importance of pharmacodynamics in determining the dosing interval in therapy for experimental pseudomonas endocarditis in the rat. *J Infect Dis* 1986; 153: 707-713.
  185. Contrepois A, Faurisson F, Bauchet J et al. Comparative kinetics, extravascular diffusion, and activity of fleroxacin and ciprofloxacin in experimental *Escherichia coli* endocarditis in rabbits. *Rev Infect Dis* 1989; 11 (Supl 5): 1.204-1.205.
  186. Fantin B, Pangon B, Potel G, Vallais JM, Caron F, Buke A et al. Ceftriaxone-netilmicin combination in single-daily-dose treatment of experimental

- Escherichia coli* endocarditis. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33: 767-770.
187. Fantin B, Carbon C. Importance of the aminoglycoside dosing regimen in the penicillin-netilmicin combination for treatment of *Enterococcus faecalis*-induced experimental endocarditis. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34: 2.387-2.391.
  188. Gavalda J, Cardona PJ, Almirante B, Capdevila JA, Laguarda M, Pou L et al. Treatment of experimental endocarditis due to *Enterococcus faecalis* using once-daily dosing regimen of gentamicin plus simulated profiles of ampicillin in human serum. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 173-178.
  189. Blatter M, Fluckiger U, Entenza J, Glauser MP, Francioli P. Simulated human serum profiles of one daily dose of ceftriaxone plus netilmicin in treatment of experimental streptococcal endocarditis. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37: 1.971-1.976.
  190. Dorsher CW, Tallan BM, Rouse MS, Steckelberg JM, Chambers HC, Wilson WR et al. Effect of gentamicin dosing interval on ceftriaxone or penicillin treatment (Rx) of *viridans* streptococcal experimental endocarditis [resumen 700]. En: Programs and Abstracts of the 30th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1990, American Society for Microbiology, Atlanta.
  191. Chambers H, Kennedy S, Fournier M, Rouse MS, Wilson WR. Ceftriaxone vs penicillin alone and with gentamicin in viridans streptococcal aortic valve endocarditis [resumen 701]. En: Programs and Abstracts of the 30th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1990; American Society for Microbiology, Atlanta.
  192. Saleh-Mghir A, Cremieux AC, Vallois JM, Muffat-Joly M, Devine C, Carbon C. Optimal aminoglycoside dosing regimen for penicillin-tobramycin synergism in experimental *Streptococcus adjacens* endocarditis. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36: 2.403-2.407.
  193. Gavalda J, Pahissa A, Almirante B, Laguarda M, Crespo E, Pou L et al. Effect of gentamicin dosing interval on therapy of *viridans* streptococcal experimental endocarditis with gentamicin plus penicillin. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 2.098-2.103.

## DISCUSIÓN

- J.M. MIRÓ: Últimamente algunos grupos trabajan con modelos humanizados en rata por tratarse tal vez de un animal más económico, por lo que en el futuro podría ser un modelo a implementar igual que el de conejo. ¿Cuáles son las diferencias fundamentales entre el modelo en rata y en conejo?
- J. GAVALDÀ: Con rata es más económico y las condiciones de estabulación son más sencillas, aunque existe el gran inconveniente de que la vegetación es muy pequeña y la cantidad de bacterias existente en la vegetación es, por tanto, relativamente pequeña, respecto a lo que se observa en conejo. Esto limita la realización de estudios de aparición de resistencias con este animal, por lo que se considera preferente el empleo del modelo con conejo.
- J.M. GATELL: No me queda claro por qué desaparece o por qué se cura de una forma espontánea la endocarditis al retirar el catéter, ya que esto es una diferencia importante con lo que ocurre en el hombre.
- J. GAVALDÀ: Los mecanismos inmunitarios de los animales son totalmente diferentes a los de los humanos. Posiblemente, aunque la vegetación sea madura, necesita una noxa permanente para que haya más depósitos de plaquetas y para que las células inmunitarias del torrente circulatorio no consigan entrar en la circulación y curarlas. Son pequeños trucos que tienen los modelos que intentan sobrepasar este aumento de la inmunidad que ocurre en los animales de laboratorio.
- F. MARCO: Has comentado que se sacrifican los animales a las 24 h, pero si esperamos mucho tiempo corremos el riesgo de que se produzca un recrecimiento de las bacterias en el interior de las vegetaciones. ¿Podemos jugar con este tiempo dependiendo de la semivida del antibiótico, del grado de permeabilidad o de penetración del antibiótico al interior de la vegetación?
- J. GAVALDÀ: Me refería a un tiempo de 24 h para el caso de administración intramuscular sin farmacocinética humanizada; es decir, que tenemos la última administración a las 8 h del día anterior, por lo tanto hay valores de antibiótico durante mucho tiempo. Creemos que se debe sacrificar los animales cuando no haya antibiótico pero tampoco haya posibilidades de recrecimiento. Si has utilizado farmacocinética humanizada, probablemente podrás sacrificar los animales al cabo de 2 h de acabar la infusión porque ya están en el valle y no habrá efecto residual. Si tardamos más, el problema del sobrecrecimiento es muy importante porque, evidentemente, tendremos animales que a lo mejor están curados, animales que tendrán 100 o 1.000 bacterias y animales que a lo mejor tienen 10.000. Nos podemos encontrar que el de 1.000 nos crezcan dos logaritmos y el otro ya aparezca como el control. Es importante de-

mostrar que no haya antibiótico, sobre todo en los animales curados. Si dices que tienes animales curados debes hacer un bioensayo de tus homogeneizados para demostrar que no hay trazas de antibióticos, o centrifugar bien los homogeneizados y resuspenderlos para extraer el posible antibiótico que haya, sobre todo en los animales curados. En los otros no, porque ya tienes crecimientos y haces diluciones y este posible efecto residual quedaría anulado.

J.M. MIRÓ: Un tema que es bastante controvertido es el momento de iniciar el tratamiento, porque si comienzas muy pronto aún estás en la fase de crecimiento logarítmico, cuando la vegetación no es madura y en este caso probablemente los antibióticos betalactámicos y aminoglucosídicos podrán tener una mayor actividad. Si, por el contrario, esperas más de 24-48 h, la vegetación es madura, habrá una subpoblación metabólica latente y quizás ese efecto del antibiótico no quedará reflejado. ¿Cuáles son los criterios para comenzar a las 16 o 24 h?, porque la interpretación de los resultados puede cambiar mucho, y en el ser humano, cuando se inicia el tratamiento las vegetaciones son maduras en todos los casos.

J. GAVALDA: Se trata de limitaciones del modelo. Por ejemplo, en la endocarditis por *S. aureus* no se pueden alcanzar vegetaciones maduras porque la sepsis inducida al animal es tan importante que el 70 % de ellos muere si esperas la obtención de vegetaciones maduras. Por ello se debe buscar un punto en que la mortalidad del grupo de control sea aceptable, es decir, un 30 % de muertes, que en *S. aureus* no puede ser mayor de 16 o 18 h. En los otros modelos es recomendable esperar como mínimo entre 48 y 72 h, aunque también te puedes encontrar que al esperar 48 h muera el 35 % de animales del grupo control. Lo recomendable sería que cada vez que se empieza un experimento con una cepa diferente de una especie diferente se estandarizase y, a ser posible, esperar 48 h, pero si la mortalidad a 48 h es muy alta se debe ir reduciendo el tiempo hasta una mortalidad de alrededor del 15 o del 20 %. Es lo que habitualmente hacemos y, luego, otro aspecto muy importante es comprobar que no se curan los animales sin antibióticos; es decir, la estandarización también te ayuda a que en el resto de animales que sobreviven hasta el final la concentración bacteriana de la vegetación se mantenga constante y no descienda.

---

# Modelo de meningitis

---

Carmen Cabellos<sup>a,\*</sup>, Jerónimo Pachón<sup>b</sup> y Benito Almirante<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Enfermedades Infecciosas. Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge. L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona.

<sup>b</sup>Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Virgen del Rocío. Sevilla.

<sup>c</sup>Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona.

---

## RESUMEN

La mortalidad y morbilidad de la meningitis bacteriana no había variado de forma significativa en los últimos años a pesar del uso de potentes antibióticos. En las últimas décadas se han utilizado ampliamente varios modelos bien estandarizados, especialmente el de meningitis neumocócica en conejos y el de *Haemophilus influenzae* en ratas. Gracias a ellos se ha podido avanzar en dos grandes aspectos: un mayor conocimiento de la fisiopatología de las meningitis bacterianas, y especialmente de algunas etiologías, y el avance en el estudio de posibilidades terapéuticas, muy importante desde la aparición de la resistencia a la penicilina y a otros antimicrobianos.

El modelo más utilizado es el de Dacey y Sande. En él se utilizan conejos blancos de Nueva Zelanda que son anestesiados con ketamina y xilazina, y a los cuales se les coloca sobre el cráneo una pieza metálica protegida y fijada por un casco de cemento acrílico. Veinticuatro horas después los animales son anestesiados de nuevo y son colocados en el aparato de estereotaxia, donde quedarán inmovilizados gracias a la pieza metálica que se les había colocado previamente. Se introduce una aguja de punción lumbar en la cisterna magna y se inoculan en el espacio subaracnoideo *Streptococcus pneumoniae* u otro microorganismo o sustancia que se desee estudiar.

Dieciocho horas después los conejos son anestesiados de nuevo con uretano y fenobarbital y son colocados otra vez en el aparato de estereotaxia. Se introduce un catéter intravenoso en la vena marginal de la oreja y se extrae una muestra de líquido cefalorraquídeo pretratamiento. Posteriormente se pueden administrar las dosis de tratamiento y extraer muestras seriadas de líquido cefalorraquídeo según los esquemas prefijados.

### Palabras clave:

Meningitis experimental. Patología. Tratamiento.

---

## MENINGITIS MODEL

Mortality and morbidity of bacterial meningitis had not changed significantly in the last years despite the use of potent antibiotics. In the last decades, several models well standardized have been used, specially the rabbit model of pneumococcal meningitis and the rat model of *Haemophilus influenzae* meningitis. With the use of these models the study of several aspects of the physiopathology of bacterial meningitis, specially in some etiologies, and the study of different therapeutic possibilities, specially important since the breakdown of penicillin resistance have been possible. The most currently used model is the Dacey and Sande model which uses New Zealand white rabbits. The animals are anesthetized with ketamine and xylazine and a dental acrylic helmet is afixed to the calvarium. This metallic piece is needed to fix the rabbits to the stereotaxic frame. Twenty-four hours later the animals are anesthetized again and fixed to the stereotaxic frame. A spinal needle is introduced to the cisterna magna and *S. pneumoniae* or other microorganism or substances are inoculated into the subarachnoidal space. Eighteen hours later the animals are anesthetized again with urethane and phenobarbital and placed again in the frame. An intravenous catheter is instated in the marginal ear vein and a pre-treatment CSF sample is taken. During the next hours the different therapies are administered and several CSF samples are taken at different time points as scheduled.

### Key words:

Experimental meningitis. Pathology. Therapy.

---

\*Correo electrónico: ccabellos@csub.scs.es.

## Introducción histórica

La utilización de modelos animales de meningitis experimental se ha extendido en las últimas 3 décadas debido a la necesidad de estudiar aspectos no bien conocidos de la meningitis bacteriana. En los últimos años, y a pesar de la aparición de potentes y eficaces antibióticos, no ha disminuido de forma notable la mortalidad de esta enfermedad y especialmente de la meningitis neumocócica; esta última etiología es la que presenta una mortalidad mayor entre los patógenos más frecuentes. Los modelos de meningitis neumocócica experimental han sido fundamentales para conocer su fisiopatología y los aspectos relacionados con su mayor capacidad de generar respuesta inflamatoria. El segundo aspecto importante para el que se han utilizado los modelos de meningitis ha sido el estudio de nuevas posibilidades de tratamientos antibióticos, especialmente necesarios desde la aparición de la resistencia de *Streptococcus pneumoniae* a la penicilina y a otros antibióticos.

Los primeros modelos que podrían corresponder a meningitis experimental datan de finales del siglo XIX. Al mismo tiempo que se describieron los tres principales patógenos meníngeos, se realizó la inoculación directa de líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes afectados de meningitis a animales para establecer la posible etiología y para comprobar los postulados de Koch<sup>1</sup>. Así se estableció el papel etiológico para *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* y *S. pneumoniae* en la meningitis bacteriana y se estudiaron diversas modalidades terapéuticas como el uso de antisuero<sup>2</sup>, lavado subaracnoideo con agentes antisépticos<sup>3</sup> o enzimas proteolíticas. Finalmente, a partir de los años cuarenta se inició el uso de antibióticos.

A lo largo de estos años, se han utilizado una amplia variedad de modelos que usaban diferentes animales incluyendo ratas, cobayas, conejos, gatos, perros, cabras y monos. Se han estudiado una larga variedad de microorganismos como meningococo, neumococo, *H. influenzae*, enterobacterias, etc., y muy diversas vías de producción de la meningitis. Los intentos de reproducir la meningitis mediante inoculación intravenosa de bacterias fracasaban a menos que las meninges fueran alteradas antes de la inoculación<sup>4</sup>. Otras vías que se intentaron fueron intranasal<sup>5</sup>, intragástrica, intraperitoneal, intrasinal, intra-orbitaria, subdural o intratecal. La vía intracisternal se fue situando como la que con mayor fiabilidad producía meningitis experimental. Esta técnica se utilizó por primera vez en 1913<sup>6</sup> y pos-

teriormente se ha confirmado como altamente reproducible en múltiples estudios. El principal inconveniente de esta vía es que la infección se produce por inoculación directa y no por diseminación hematógena, que es la vía más frecuente, presentando una patogenesia artificial. Así mismo, puede existir una mortalidad por lesión directa de estructuras de sistema nervioso en la punción.

Los estudios más importantes realizados con estos modelos han sido con neumococos, *H. influenzae* y enterobacterias. Se ha podido crear un modelo en conejos prácticamente para todos estos microorganismos, mientras que el uso de animales de gran tamaño se ve limitado por el coste, y el de animales de pequeño tamaño por la limitación en el número de muestras de LCR que se pueden obtener. Este modelo en conejos reúne, además, la ventaja de su fácil manejo, coste bajo y un volumen suficiente de LCR para comprobar la respuesta a los tratamientos antibióticos y determinar la concentración bacteriana.

## Modelos de meningitis experimental

### *Modelo de meningitis neumocócica en conejos*

El modelo de meningitis experimental que se ha impuesto con el paso de los años es el de Dacey y Sande<sup>7</sup>. Éste es el que más ha contribuido a avanzar en el conocimiento de la fisiopatología de la meningitis bacteriana y en el estudio de las nuevas posibilidades terapéuticas. Ha sido ampliamente utilizado para estudiar la meningitis neumocócica pero también la meningitis por *H. influenzae* y por *Escherichia coli*.

Se utilizan conejos blancos de Nueva Zelanda, preferentemente hembras (porque tienen menos requerimientos de anestesia), de 2 kg de peso. Los animales deben llegar al estabulario por lo menos una semana antes de ser utilizados para permitir su adecuada aclimatación. Pueden disponer de agua y pienso sin restricciones.

La primera fase necesaria para utilizar el modelo consiste en una pequeña intervención quirúrgica para la colocación de una pieza fijada a la calota craneal de tal manera que permita la sujeción al aparato de estereotaxia. Es necesaria la presencia de dos personas, una que realizará la cirugía en condiciones de asepsia: bata, guantes, mascarilla, gorro, etc., y un ayudante que preparará al animal y que colaborará para mantener la asepsia. Al iniciar el procedimiento pueden utilizarse 0,5 ml de diazepam subcutáneo para tranquilizar al animal y que permita la ad-



ministración de la anestesia. Como anestesia se utilizan 35 mg/kg de ketamina y 5 mg/kg de xilazina i.m.

Una vez el animal está completamente dormido, se rasuran la cara externa de las orejas y la calota craneal, y se desinfectan con povidona yodada. Se coloca el animal sobre el campo quirúrgico previamente preparado, se cubre con una talla fenestrada y se procede a la pequeña cirugía. Se realiza una pequeña incisión de 2 cm sobre el eje longitudinal del cráneo, a la altura del cruce de suturas óseas. Se separa el periostio y con la ayuda de un perforador se realizan cuatro pequeños agujeros sobre la calota craneal, sin atravesar completamente el diploe. Estos pequeños agujeros se sitúan equidistantes y aproximadamente a 5 mm del cruce de suturas. Se fijan 4 tornillos metálicos que servirán para guiar la colocación de una horquilla metálica, provista de una rosca donde posteriormente podrá fijarse un vástago. Una vez colocados los tornillos y la horquilla se cubre todo con cemento acrílico. Este cemento, habitualmente de uso en odontología, puede obtenerse comercialmente. El cemento se obtiene mezclando un polvo y un líquido momentos antes de su utilización, formando una masa que se moldea con las manos y se coloca, formando un cubo, sobre las piezas metálicas fijadas a la calota craneal de tal manera que cubra todos los metales y la herida quirúrgica. Este cubo de cemento acrílico, que sólo deja libre la rosca donde se fijará el vástago, se endurece de inmediato, lo que aumenta de forma importante su temperatura. Cuando está completamente duro, se enfría bajo un chorro de agua corriente. Se recuesta el animal y se mantiene en observación hasta la completa recuperación de la anestesia, momento en el que puede ser devuelto a la jaula, hasta el día siguiente.

A partir de las 18 h de la cirugía, puede procederse a la inoculación. Los animales son anestesiados de nuevo con ketamina y xilazina. Se coloca un vástago metálico enroscado en la pieza que se había fijado sobre la calota craneal. Esta pieza metálica será la que servirá para fijarlo al aparato de estereotaxia de tal manera que el conejo podrá permanecer en la misma posición, sentado con el cuello erguido y el cráneo en la orientación que se precise para realizar la punción lumbar. El aparato consta de un segundo brazo articulado al que se fijará la aguja de punción lumbar y que permitirá acercarla y realizar la punción de forma controlada en el punto que se desee. Este punto se determina previamente por palpación. Se desinfecta la zona del cuello con alcohol e inmediatamente se pincha con una aguja de PL de 25 G

que se introduce en la cisterna magna hasta notar una suave resistencia. Habitualmente se extraen unos 200  $\mu$ l de LCR inmediatamente antes de realizar la inoculación. Para las extracciones y la inoculación se utilizarán agujas de insulina de 1 ml que se pueden acoplar a la aguja de punción lumbar (PL) tras retirar el fiador. Se puede mover la aguja con la ayuda del brazo donde va fijada. La inoculación en el espacio subaracnoideo se realiza, así mismo, en 200  $\mu$ l de líquido. Se puede inocular el microorganismo causante de la meningitis que se desee estudiar, sustancias de las que se desee conocer su actuación en el LCR, etc. *S. pneumoniae* es el microorganismo que ha sido objeto de estudio con mayor frecuencia.

Dieciocho horas después la meningitis estará totalmente establecida. En el modelo más clásico es el momento de iniciar el tratamiento. Los conejos son anestesiados de nuevo con uretano (1,75 g/kg subcutáneo) y se coloca un catéter intravenoso (pediátrico) en la vena marginal de la oreja. Así se podrá suplementar la anestesia con fenobarbital (5 mg/kg i.v.). Se colocan de nuevo los animales en el aparato de estereotaxia y se extrae una muestra de LCR pretratamiento. Se administra entonces la primera dosis de antibiótico; las dosis siguientes se administran a diferentes intervalos según el esquema prefijado que dependerá de la farmacocinética del antibiótico, entre otros aspectos. A partir de aquí se podrán realizar extracciones seriadas de LCR cada hora, cada 2 h o según el esquema horario que se haya definido para cada experimento, dependiendo de los datos que sea necesario conocer. En los experimentos de tratamiento se suelen mantener 24 o 48 h y se extraen muestras de LCR a las horas prefijadas. En los experimentos en los que se estudia el efecto de una sustancia, la extracción de muestras dependerá del diseño. Las muestras de LCR pueden procesarse para realizar todo tipo de determinaciones microbiológicas y bioquímicas. Las más usuales son recuento de células, concentración de proteínas y ácido láctico, cultivo directo y cuantitativo, concentraciones de antibiótico y poderes bactericidas en el pico y en el valle.

Cuando ha finalizado el experimento los animales son sacrificados con una sobredosis de fenobarbital. Para determinar la presencia de edema cerebral como un parámetro inflamatorio más puede extraerse el cerebro abriendo la calota craneal; se pesa y tras secado durante una semana en estufa a 100 °C se determina el peso seco. El edema cerebral se expresa como g de agua por 100 g de peso seco. Si el experimento se prolonga durante 24-48 h conviene hidratar al conejo

con 20 ml de suero, glucosado y fisiológico a partes iguales, que puede administrarse por vía subcutánea cada 12 h. Así mismo, conviene vigilar la situación de los conejos y, si es preciso, sacrificarlos antes de finalizar el tiempo prefijado cuando aparecen signos de sufrimiento.

#### *Modelo de meningitis por Pseudomonas aeruginosa en cobaya*

Este modelo ha sido desarrollado recientemente en el Laboratorio de Infección Experimental del Hospital de Bellvitge por J.M. Maiques para poder estudiar la acción de meropenem en la meningitis por *P. aeruginosa*, ya que este fármaco no puede utilizarse en conejos. Se utilizan cobayas Hartlem hembras de 400-500 g. Los animales llegan al estabulario la semana previa al experimento y permanecen en observación bajo la supervisión de un veterinario, durante todo este tiempo. El procedimiento se inicia con la anestesia, para cada animal (400-500 g) se utiliza una combinación de 0,1 ml de xilacina (4 mg/kg) y 0,3 ml de ketamina (30 mg/kg) que se administran por punción intramuscular en la nalga (aguja de 26 G). Esta combinación deja rápidamente anestesiado al animal en menos de 2 min y sus efectos se prolongan durante una hora, tiempo necesario para su manipulación, sin que se hayan observado secuelas posteriores. Una vez que el animal ya ha sido anestesiado, se le rasura el dorso de cuello y la calota con una rasuradora eléctrica y después se le desinfecta la zona con un solución de povidona yodada.

La inoculación de las bacterias se realiza en una campana de flujo laminar y por medio de un equipo de infusión de aguja fina (27 G) con alas (Valu-Set 27 G 3/8 0,4 × 10). Con una micropipeta se toma una muestra de 100 µl del volumen del inóculo bacteriano previamente preparado que se inyecta dentro del tubo del equipo. Después se conecta una jeringuilla de 1 ml, y con la presión del émbolo se lleva la columna de líquido hasta la base de la aguja. Con un rotulador se marca en el tubo el punto hasta donde llega el extremo de dicha columna. Se localiza por tacto la hendidura occípito-atloidea en la nuca del cobaya y se introduce la aguja del equipo de infusión hasta la cisterna subaracnoidea. Se sabe que se está en el sitio adecuado porque al aspirar con el émbolo de la jeringa se extrae LCR del animal. En ese momento se introduce lentamente el volumen del inóculo bacteriano. Finalizado este proceso los animales son depositados en jaulas apropiadas y alojados en una cámara ambiental de presión negativa, especial para la es-

tabulación de animales infectados y potencialmente contaminantes. Se vigila que se recuperen bien de la anestesia y se les proporcionan agua y pienso. La respuesta inflamatoria a la infección inducida se desarrolla suficientemente en tan sólo 4 h, tiempo que se considera adecuado para iniciar los procedimientos terapéuticos objeto de estudio. A partir de este momento se puede proceder a la administración de los antibióticos. Los antibióticos seleccionados se reconstituyen con una cantidad de diluyente adecuado para que el volumen del preparado administrado sea semejante en todos los casos (0,4-0,5 ml). Este volumen se administra por vía intramuscular en la nalga del animal con una jeringuilla de 1 ml y una aguja de 26 G.

En el momento en el que deben obtenerse las muestras, los animales son anestesiados con la misma combinación de xilacina y ketamina mencionada anteriormente. Después, por punción cardíaca directa se obtienen entre 5 y 10 ml de sangre y por la misma vía se administra 1 ml de pentotal sódico que provoca la muerte instantánea del animal.

Por cada animal empleado tan sólo es posible obtener una muestra biológica. La sangre se obtiene por la punción cardíaca directa ya mencionada. El LCR se obtiene, inmediatamente después de la administración del pentotal, por punción en la cisterna magna con el mismo equipo y por un procedimiento semejante al empleado en la inoculación. De esta forma se consigue obtener entre 50 y 300 µl de LCR, que se distribuyen en alícuotas en tubos de Eppendorf para su posterior análisis. La extracción del cerebro precisa de una pequeña intervención quirúrgica y conviene hacerla en condiciones de esterilidad. Con ayuda de un bisturí y unas pequeñas pinzas de disección se disecciona la piel, la aponeurosis y el periostio de la zona de la calota. Con un taladro manual se practica un agujero en la confluencia de las suturas interparietal y frontal; a través de este agujero se introduce la punta de unas pinzas y por tracción se desarticulan los huesos de la calota dejando expuesta toda la superficie cerebral. Se vuelca el cráneo y con un bisturí se secciona el cerebro a la altura del tronco, depositándolo en un recipiente estéril. En este momento se pueden tomar muestras para cultivo de la superficie meníngea del interior del cráneo con un escobillón de algodón.

#### *Modelo de meningitis por H. influenzae en ratas*

Este modelo fue descrito por Moxon et al<sup>8</sup>. Se utilizan ratas Sprague-Dawley de 5 días de edad

y *H. influenzae* serotipo b. Sin necesidad de anestesia previa se inoculan  $10^7$  unidades formadoras de colonias (UFC) en 0,1 ml mediante la inserción de una aguja de 24 G en las fosas nasales y con una jeringa Hamilton. Hay que tener especial cuidado en no lesionar la mucosa. Se produce posteriormente la presencia de bacteriemia que condicionará la siembra meníngea. La positividad de los cultivos de LCR se produce aproximadamente a las 48 h. Este modelo ha sido ampliamente utilizado en los estudios de patogenia de meningitis puesto que reproduce más fielmente la de la infección humana, pero no es tan útil para el estudio de eficacia antibiótica puesto que al ser un modelo con un animal de pequeño tamaño permite obtener una muestra reducida del LCR.

#### Otros modelos

Un modelo basado en el anterior pero con inoculación orogástrica se ha desarrollado para estudiar la meningitis por *E. coli*. Otros modelos que se desarrollaron en su día pero que no se han impuesto incluyen un modelo de meningitis por *H. influenzae* en primates<sup>10</sup>, un modelo de meningitis neumocócica en conejos que utiliza la vía hematológica<sup>11</sup>, y precisa el pase previo de la cepa *S. pneumoniae* por peritoneo de ratón, y realizar una punción en la cisterna magna para administrar mucina. Se produce la meningitis por siembra hematológica a partir de la bacteriemia en un 80 % de los conejos aproximadamente.

#### Ventajas y limitaciones del modelo

Los modelos experimentales con animales permiten plantearse e investigar problemas que son muy difíciles de estudiar en humanos, como son los mecanismos por los que las bacterias penetran en la barrera hematoencefálica y sus efectos sobre la misma, los mecanismos de defensa en el LCR y su dinámica, el papel de múltiples citocinas en la cascada inflamatoria, el posible papel de anticuerpos monoclonales o antagonistas de sustancias en el tratamiento de la meningitis, etc. Así mismo, pueden ayudar a disminuir el número de ensayos clínicos antes de la utilización de un nuevo fármaco.

En el caso del modelo de meningitis neumocócica en conejos también pueden considerarse ventajas su fácil manejo, su coste bajo y el hecho de poder tomar muestras seriadas de LCR con un volumen suficiente para realizar diversas determinaciones bioquímicas o microbiológicas en cada punto horario en el mismo animal. Esto es

una gran ventaja cuando se estudia la respuesta a antibióticos nuevos o combinaciones de las que no existe experiencia.

La principal limitación de este modelo es su patogenia artificial. Reproduce más fielmente la patogenia de una meningitis neumocócica “de foco contiguo”, como sería la secundaria a la presencia de una fistula de LCR o de otitis o sinusitis aguda, pero no la que se produce por siembra hematológica a partir de un foco de neumonía o desconocido.

Otra limitación viene dada por la posibilidad de tener mortalidad añadida por punción directa de estructuras del sistema nervioso central (SNC) al intentar la punción de la cisterna magna.

Otros modelos, especialmente los que utilizan animales pequeños, tienen el inconveniente de no poder obtener más de una muestra en el mismo animal y tener que sacrificar a grupos de animales distintos en cada punto horario para conocer la evolución en el tiempo. El modelo que utiliza primates está limitado, obviamente, por el coste.

#### Avances en la fisiopatología de la meningitis bacteriana

Los estudios realizados con el modelo de meningitis por *H. influenzae* en ratas fueron realizados en su mayoría en las décadas de los setenta y ochenta, y permitieron estudiar los mecanismos de defensa<sup>12</sup>, contribuyeron a los conocimientos previos para el desarrollo de la vacuna<sup>13</sup> y establecieron el papel del complemento en el enfermedad invasiva<sup>14</sup>. El modelo de meningitis neumocócica en conejos con inoculación intravenosa se ha utilizado para estudiar los cambios hemodinámicos que genera la enfermedad<sup>15</sup> y para describir con detalle la inflamación en el espacio subaracnoideo<sup>16</sup>. También se realizaron con él estudios sobre el efecto de metilprednisolona en los parámetros inflamatorios.

El modelo de Dacey y Sande ha sido utilizado para estudiar el papel del complemento y de las inmunoglobulinas, que presentan un déficit relativo, importante en una infección donde los anticuerpos específicos y el complemento serían esenciales para la opsonización de los patógenos meníngeos encapsulados y para conseguir una fagocitosis eficaz. También se han realizado estudios sobre la dinámica del LCR<sup>17</sup>, la penetración de antibióticos en el LCR<sup>18</sup> y los diversos mecanismos que influyen en la misma (estado “inflamatorio” de la barrera, peso molecular de la sustancia, grado de ionización, solubilidad en lípidos, fijación a proteínas, etc.).

Un capítulo muy interesante lo constituyen los experimentos, llevados a cabo por diversos grupos, encaminados a conocer la respuesta inflamatoria en la meningitis neumocócica y por *H. influenzae*. En la infección neumocócica se ha logrado demostrar que los polisacáridos capsulares no son inflamatorios y que sí lo es la pared celular<sup>19,20</sup>, y dentro de ésta el ácido teicoico, que es capaz de generar pleocitosis, aumento de la concentración de proteínas en el LCR y edema cerebral. En la meningitis por *H. influenzae* se ha demostrado que este papel generador de respuesta inflamatoria corresponde al lipopolisacárido<sup>21</sup>. Se ha demostrado que esta endotoxina genera las alteraciones citoquímicas del LCR, altera la circulación cerebral, aumenta la presión intracraneal y produce edema cerebral. La presencia de estos productos bacterianos en el espacio subaracnoideo estimula la liberación de mediadores de la inflamación en el LCR, entre ellos el factor de necrosis tumoral y la interleucina 1 $\beta$ <sup>22,23</sup>, los metabolitos del ácido araquidónico, el factor activador de las plaquetas<sup>24</sup>, otras interleucinas, proteínas inflamatorias del macrófago (MIP 1 y MIP 2), prostaglandinas, etc.<sup>25</sup>. Toda esta cascada ha podido dibujarse gracias al modelo, realizando experimentos que incluyen la demostración de concentraciones elevadas de determinadas citocinas después de la inoculación de bacterias vivas, de pared celular o lipopolisacárido, o estudiando la respuesta producida por la inoculación intracisternal de estas citocinas con o sin antagonistas o anticuerpos.

Otro punto de la fisiopatología que ha permitido estudiar los modelos es la activación de los leucocitos polimorfonucleares<sup>26</sup>. Éstos se adhieren a receptores específicos de las células endoteliales y liberan productos tóxicos que lesionan las células endoteliales, provocan un aumento progresivo de la separación entre las finas uniones de las células y aumentan la formación de vesículas pinocíticas. La consecuencia es lo que se conoce como apertura de la barrera hematoencefálica. Cuando todos estos mecanismos, la activación de la cascada de citocinas y mediadores, de las células endoteliales y de los leucocitos, y el consiguiente aumento de permeabilidad de la barrera hematoencefálica, se han desencadenado, se producen el edema cerebral y el aumento de la presión intracraneal<sup>27</sup>. En el modelo experimental se ha podido demostrar cómo el inicio del tratamiento antibiótico, especialmente con betalactámicos, con su destrucción masiva de células bacterianas, provoca la exposición de gran número de "piezas" bacterianas, como la pared celular neumocócica, capaces de desen-

cadenar la respuesta inflamatoria y, así, ésta se ve multiplicada al iniciarse el tratamiento antibiótico. Se ha podido demostrar este aumento en los modelos experimentales por *E. coli*, *H. influenzae* o *S. pneumoniae*<sup>28,29</sup>. Toda esta visión de la fisiopatología y de los efectos del tratamiento antibiótico llevaron a pensar en nuevas estrategias terapéuticas que incluyan, además de los antibióticos, tratamientos encaminados a modular la respuesta inflamatoria. Los experimentos que se han realizado incluyen el uso de sustancias que bloqueen a los mediadores de la inflamación como anticuerpos antilinterleucina 1 o antifactor de necrosis tumoral; de momento no se han conseguido resultados concluyentes como para imponerse en la clínica, excepto el uso de dexametasona en determinadas etiologías<sup>30</sup>. También del conocimiento de la multiplicación de la cascada inflamatoria que se ha visto anteriormente nace la recomendación, hoy día plenamente aceptada, de administrar la dexametasona inmediatamente antes del inicio del tratamiento antibiótico.

### Avances en el tratamiento de la meningitis bacteriana

Los modelos también se han utilizado para estudiar la actividad de los antibióticos en el LCR, la forma de administración más adecuada, intermitente respecto a perfusión continua, la necesidad de utilizar antibióticos bactericidas, así como la necesidad de conseguir concentraciones de antibióticos de 10 a 20 veces superiores a la concentración mínima bactericida (CMB)<sup>31</sup>.

Se han evaluado un amplísimo número de tratamientos con el modelo de meningitis experimental en conejos, entre los que se incluyen penicilinas de todo tipo, cefalosporinas de diversas generaciones, aminoglucósidos, cloramfenicol, glucopéptidos, antifúngicos, etc.

Además de estudiar su posible eficacia en la disminución de la concentración bacteriana o esterilizar el LCR, habitualmente se puede estudiar el porcentaje de penetración, la presencia de sinergia en una combinación antibiótica, etc. Las cefalosporinas de tercera generación, que tanta importancia tienen actualmente en el tratamiento de las meningitis bacterianas, fueron ampliamente evaluadas antes de su aparición y en los primeros años con los modelos de meningitis experimental, y demostraron cumplir los criterios de conseguir concentraciones en el LCR que excedía de 10 a 20 veces la CMB<sup>32</sup>. Como un avance muy significativo, conseguían poderes bactericidas en el LCR de 1:64 en situaciones de infección por enterobacterias.

Con la aparición y extensión mundial de la resistencia del neumococo a la penicilina y a las cefalosporinas de tercera generación, el modelo de meningitis neumocócica en conejos se ha revelado como un gran instrumento y se ha utilizado ampliamente para evaluar posibles alternativas terapéuticas, entre las que se encuentran estudios comparativos de diversas cefalosporinas, evaluación de nuevas quinolonas<sup>33</sup>, glucopéptidos con rifampicina<sup>34</sup>, estudios de combinaciones de betalactámicos y glucopéptidos, especialmente ceftriaxona y vancomicina<sup>33</sup>, betalactámicos (ceftriaxona, cefotaxima, amoxicilina o ceftipiro<sup>35,36</sup> y rifampicina), betalactámicos con fosfomicina<sup>35,36</sup>, evaluación de nuevos glucopéptidos con y sin ceftriaxona<sup>37,38</sup>, etc. En general, casi todos los nuevos antimicrobianos que se cree que puede tener un papel en las infecciones por grampositivos se evalúan con el modelo de meningitis neumocócica experimental<sup>39</sup>.

Otro grupo importante de experimentos es el que ha permitido demostrar la alteración que produce el uso de dexametasona en la penetración de determinados antibióticos en el LCR, especialmente la vancomicina, cuya concentración disminuye<sup>40,41</sup>.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Councilman WT, Mallory FB, Wright JH. Epidemic cerebrospinal meningitis and its relation to other forms of meningitis. A report of the state board of Massachusetts. Boston: Wright and Potter Printing Co., 1898.
2. Flexner S. Concerning a serum-therapy for experimental infection with diplococcus intracellularis. J Exp Med 1907; 9: 168-185.
3. Weed LH, Wegforth P. Experimental irrigation of the subarachnoid space. J Pharmacol 1919; 13: 317-334.
4. Amoss HI, Ebersson F. Experiments on the mode of infection in epidemic meningitis. J Exp Med 1919; 29: 605-618.
5. Austrian CR. Experimental meningococcus meningitis. Bull John Hopkins Hosp 1918; 29: 183-185.
6. Dixon We, Halliburton WD. The cerebrospinal fluid. I. Secretion of the fluid. J Phylol (Londres) 1913; 47: 215-242.
7. Dacey RG, Sande MA. Effect of probenecid on cerebrospinal fluid concentration of penicillin and cephalosporin derivatives. Antimicrob Agents Chemother 1974; 6: 437-441.
8. Moxon ER, Glode MP, Sutton A, Robbins JB. The infant rat as a model of bacterial meningitis. J Infect Dis 1977; 136 (Supl): 186-190.
9. McCracken GH, Mize SG, Threlkeld N. Intraventricular gentamicin therapy in gram-negative bacillary meningitis. Lancet 1980; 1: 787-791.
10. Scheifele DW, Daum RS, Syriopoulou VP, Averill DR, Smith AL. *Haemophilus influenzae* bacteremia and meningitis in infant primates. J Lab Clin Med 1980; 95: 450-462.
11. O'Donoghue JM, Schweid AI, Beaty HN. Experimental pneumococcal meningitis I. A rabbit model. Proc Soc Exp Biol Med 1974; 146: 571-574.
12. Moxon ER, Anderson P. Meningitis caused by *Haemophilus influenzae* in infants rats: protective immunity and antibody priming by gastrointestinal colonization with *Escherichia coli*. J Infect Dis 1979; 140: 471-478.
13. Weller PF, Smith AL, Smith DH, Anderson P. The role of encapsulation and host age in the clearance of *Haemophilus influenzae* bacteremia. J Infect Dis 1977; 135: 34-41.
14. Corral CJ, Winkelstein JA, Moxon ER. Participation of complement in host defense against encapsulated *Haemophilus influenzae* types a, c and d. Infect Immun 1982; 35: 759-763.
15. Sears MR, O'Donoghue JM, Fisher HK, Beaty HN. Effect of experimental pneumococcal meningitis on respiration and circulation in the rabbit. J Clin Invest 1974; 54: 18-23.
16. McAllister CK, O'Donoghue JM, Beaty HN. Experimental pneumococcal meningitis. II. Characterization and quantitation of the inflammatory process. J Infect Dis 1975; 132: 355-363.
17. Scheld WM, Dacey RG, Winn HR, Welsh JE, Jane JA, Sande MA. Cerebrospinal fluid outflow resistance in rabbits with experimental meningitis. Alterations with penicillin and methylprednisolone. J Clin Invest 1980; 66: 243-253.
18. Scheld WM, Brodeur JP. Effect of methylprednisolone on entry of ampicillin and gentamicin into cerebrospinal fluid in experimental pneumococcal and *Escherichia coli* meningitis. Antimicrob Agents Chemother 1983; 23: 108-112.
19. Tuomanen E, Liu H, Hengstler B, Zak O, Tomasz A. The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. J Infect Dis 1985; 151: 859-868.
20. Tomasz A, Saukkonen K. The nature of cell-derived inflammatory components of pneumococci. Pediatr Infect Dis J 1989; 8: 842-844.
21. Syrogianopoulos GA, Hansen EJ, Erwin AI, McCracken GH. *Haemophilus influenzae* type b lipooligosaccharide induces meningeal inflammation. J Infect Dis 1988; 157: 237-244.
22. Mustafa M, Ramilo O, Sáez-Llorens X, Mertsola J, McCracken GH. Role of tumor necrosis factor in experimental and clinical bacterial meningitis. Pediatr Infect Dis J 1989; 8: 907-908.
23. Ramilo O, Mustafa M, Sáez-Llorens X, McCracken GH. Role of interleukin-1 $\beta$  in meningeal inflammation. Pediatr Infect Dis J 1989; 8: 909-910.
24. Cabellos C, MacIntyre DE, Forrest M, Burroughs M, Prasad S, Tuomanen E. Differing roles for platelet-activating during inflammation of the lung and subarachnoid space. The special case of *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Invest 1992; 90: 612-618.

25. Saukkonen K, Sande S, Cioffe C, Wolpe S, Sherry B, Cerami A et al. The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental Gram-positive meningitis. *J Exp Med* 1990; 71: 439-448.
26. Ernst JD, Decazes JM, Sande MA. Experimental pneumococcal meningitis. Role of leukocytes in pathogenesis. *Infect Immun* 1983; 41: 275-279.
27. Sáez-Llorens X, Ramilo O, Mustafa MM, Mertsola J, McCracken GH. Molecular pathophysiology of bacterial meningitis: current concepts and therapeutic implications. *J Pediatr* 1990; 116: 671-684.
28. Mertsola J, Ramilo O, Mustafa MM, Sáez-Llorens X, Risser RC, McCracken GH. Release of endotoxin after antibiotic treatment of gram-negative bacterial meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 1989; 8: 904-906.
29. Tauber MG, Khayam-Bashi H, Sande MA. Effects of ampicillin and corticosteroids on brain water content, cerebrospinal fluid pressure and cerebrospinal fluid lactate levels in experimental meningitis. *J Infect Dis* 1985; 151: 528-534.
30. Syrogianopoulos GA, Olsen KD, Reisch JS, McCracken GH. Dexamethasone in the treatment of experimental *Haemophilus influenzae* type b meningitis. *J Infect Dis* 1987; 155: 213-219.
31. Sande MA. Factors influencing the penetration and activity of antibiotics in experimental meningitis. *J Infect* 1981; 3 (Supl 1): 33-38.
32. Sande MA, Scherertz RJ, Zak O, Strausbaugh LJ. Cephalosporin antibiotics in the therapy of experimental *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* meningitis in rabbits. *J Infect Dis* 1978; 137 (Supl): 161-168.
33. Friedland IR, Paris M, Ehrett S, Hickey S, Olsen KD, McCracken GH. Evaluation of antimicrobial regimens for treatment of experimental penicillin and cephalosporin resistant pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 10: 1.320-1.324.
34. Martínez-Lacasa J, Cabellos C, Fernández A, Martos A, Tubau F, Viladrich PF et al. Evaluation of vancomycin and vancocin-rifampin ± dexamethasone in the therapy of experimental pneumococcal meningitis [resumen B78]. Orlando: 34th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1994.
35. Tubau F, Cabellos C, Fernández A, Liñares J, Viladrich PF, Gudiol F et al. Experimental study of high dose cefotaxime alone and in combinations in the therapy of cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis [resumen B36]. New Orleans. 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1996.
36. Cabellos C, Tubau F, Fernández A, Maiques J, Viladrich PF, Liñares J et al. Experimental study of amoxicillin and ceftiprome alone and in combination in the therapy of cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis [resumen B75]. Toronto. 37th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1997.
37. Cabellos C, Fernández A, Maiques JM, Tubau F, Liñares J, Viladrich PF et al. Experimental study of LY333328 alone and in combination in the therapy of cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis [resumen B4]. San Diego. 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1998.
38. Fernández A, Cabellos C, Maiques JM, Tubau F, Liñares J, Viladrich PF et al. Experimental study of teicoplanin alone and in combination in the therapy of cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis [resumen B36]. San Diego. 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1998.
39. Tarasi A, Dever LI, Tomasz A. Activity of quinupristin/dalfopristin against *Streptococcus pneumoniae* *in vitro* and *in vivo* in the rabbit model of experimental meningitis. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39 (Supl A): 121-127.
40. Paris M, Hickey SM, Usher MI, Shelton S, Olsen KD, McCracken GH. Effect of dexamethasone on therapy of experimental penicillin- and cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 1.320-1.324.
41. Cabellos C, Martínez-Lacasa J, Martos A, Tubau F, Fernández A, Viladrich PF et al. Influence of dexamethasone on efficacy of ceftriaxone and vancomycin therapy in experimental pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2.158-2.160.

## DISCUSIÓN

J.M. GATELL: ¿La penetración y la farmacocinética de los antibióticos en el líquido cefalorraquídeo (LCR) del conejo se considera que es similar a la humana, o bien se debe determinar o aplicar algún tipo de ajuste? Lo comento puesto que en humanos el aclaramiento del antibiótico en LCR suele ser bastante lento.

C. CABELLOS: En general la mayoría de antibióticos presentan los mismos problemas o ventajas en nuestro modelo que en humanos. La penetración de los betalactámicos y los glucopéptidos,

por ejemplo, es relativamente baja pero normalmente suficiente, al igual que ocurre en humanos. Una excepción es la del meropenem, que debido a que el conejo carece de la enzima dihidropeptidasa, imposibilita su estudio en este animal. Habitualmente, en conejo se obtiene un pico de concentración de antibiótico en el LCR a las 2 h. Estudios realizados con antibióticos de semivida más larga, como los empleados en humanos cada 24 h, suelen evidenciar también en el conejo concentraciones plasmáticas a las

24 h, aunque la semivida plasmática se reduce un par de horas.

J.M. MIRÓ: Has comentado que vuestro grupo está desarrollando un modelo de meningitis en cobaya, ¿por qué habéis escogido este animal en lugar del conejo?

C. CABELLOS: Porque lo que queríamos estudiar era la meningitis por *Pseudomonas* y alternativas a su tratamiento, y los antibióticos carbapenémicos, como meropenem y sus combinaciones, no se pueden utilizar en el conejo. Por ello, buscamos otro modelo. Conocíamos un modelo muy sencillo pero limitado, puesto que consiste en la punción directa en la cisterna magna, la posterior comprobación de que hay líquido y finalmente se inocular directamente, sin el empleo de ninguna otra tecnología. Tan sólo se obtiene una única muestra a estudiar (de LCR, de cerebro y un cultivo de la superficie de la meninge).

F. MARCO: ¿Cuál es tu opinión sobre el futuro de las nuevas quinolonas, trovafloxacin, gemifloxacino, etc., para el tratamiento de la meningitis?

C. CABELLOS: Se dispone de datos sobre clinafloxacin con este mismo modelo y funcionó muy bien. Estamos corroborando actualmente estos datos con clinafloxacin y con cepas de las nuestras. También se ha estudiado alguna otra de las nuevas quinolonas y parece que funcionan bien, lo que presupone que se ha resuelto el problema de la penetración que presentaban

las primeras quinolonas. Si surgen problemas de resistencias habrá que estudiar combinaciones de antibióticos, de las cuales las más recomendables son los betalactámicos o glucopéptidos con rifampicina, o bien betalactámicos combinados con glucopéptidos.

J. GAVALDA: Querría plantear dos cuestiones rápidas; en primer lugar, ¿se comprueba fehacientemente también que estas combinaciones de glucopéptidos y betalactámicos son sinérgicas *in vitro*? La otra cuestión es si se han producido problemas con los cobayas en la administración de antibióticos, puesto que es conocida la posible inducción de colitis pseudomembranosa en algunas cepas de estos animales.

C. CABELLOS: Hemos demostrado la eficacia de las combinaciones estudiadas pero no se analizó la existencia de sinergia ni en su concepto clásico ni según la definición que se ha comentado en discusiones previas. Únicamente se demostró sinergia con una cepa de las que utilizó McCracken en uno de los experimentos. En cuanto a la segunda pregunta, y de momento, no han aparecido problemas de colitis en el modelo de *Pseudomonas* con ceftacidima, meropenem y tobramicina. Esto podría explicarse al tratarse de un modelo practicado en un corto período de tiempo, ya que se sacrifican los animales a las pocas horas de iniciado el experimento. Probablemente si tuvieran que mantenerse durante largos períodos de tratamiento podrían aparecer este tipo de problemas.

---

# Modelo de neumonía

---

Jerónimo Pachón<sup>a,\*</sup>, Joan Gavaldà<sup>b</sup> y Josep Maria Miró<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospitales Universitarios Virgen del Rocío. Sevilla. <sup>b</sup>Servei de Malalties Infeccioses. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona. <sup>c</sup>Servei de Malalties Infeccioses. IDIBAPS (Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer)-Hospital Clínic i Provincial. Barcelona.

---

## RESUMEN

Los modelos experimentales de neumonía se utilizan desde antes del uso clínico de las sulfamidas. Los animales utilizados han sido diversos, como perros, cobayas, ratas y ratones, que pueden ser inoculados por aspiración o por inhalación de aerosoles, entre otros métodos. Las bacterias utilizadas han sido múltiples, más frecuentemente cocos grampositivos y bacilos gramnegativos. Se describen los modelos más comunes, los que utilizan ratones y cobayas, así como los modelos de neumonía crónica. Las ventajas del modelo es que es discriminativo, o sea, se asemeja a las condiciones en las cuales se produce la neumonía en humanos. Las limitaciones son la farmacocinética diferente de los antimicrobianos en los animales de experimentación y el relativamente gran inóculo utilizado, en comparación a lo que ocurre en humanos. Por estas razones sus resultados deben ser trasladados con precaución a la clínica humana. A pesar de estas limitaciones, los modelos de neumonía han permitido conocer aspectos de la patogenia de la enfermedad, de los fenómenos inflamatorios que se producen como causantes de la lesión pulmonar y de los mecanismos de la insuficiencia respiratoria. Los modelos de neumonía crónica han permitido conocer aspectos relacionados con la infección en la fibrosis quística y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Finalmente, los modelos experimentales de neumonía han contribuido al conocimiento de la eficacia de distintos antimicrobianos en neumonías causadas por distintos microorganismos y de las características farmacodinámicas relacionadas con la eficacia del tratamiento.

### *Palabras clave:*

Modelo experimental. Fisiopatología de la neumonía. Tratamiento.

---

## PNEUMONIA MODEL

Experimental models of pneumonia had been used before the clinical use of sulfonamides. Different animal species have been used, as dogs, guinea pigs, rats, and mice, which may be inoculated by aspiration or by aerosol chambers, among other methods. Multiple bacteria have been used, more frequently grampositive cocci and gramnegative bacilli. The more common models, those using mice and guinea pigs, and the chronic pneumonia models, are described. The pneumonia models have the advantage to be a discriminative model, simulating human infection as closely as possible. The main limitations are the different pharmacokinetics of antimicrobials in animals, compared to human beings, and the relatively large inoculum used in the aspiration model. For these reasons, their results must be undertaken with caution when extrapolated to the clinical. In spite of these limitations, the pneumonia experimental models have contributed to the knowledge on the pathogenesis of the disease, on the inflammatory process causing lung damage, and on the mechanisms of the respiratory failure in the pneumonias. Chronic pneumonia models have been used to study aspects related to the infection in the cystic fibrosis and in the chronic obstructive pulmonary disease. Finally, the experimental models of pneumonia have contributed to the knowledge about the efficacy of different antimicrobials, in pneumonias caused by multiple microorganisms, and to know the pharmacodynamic parameters related with the efficacy of the treatments.

### *Key words:*

Experimental model. Pneumonia pathology. Therapy.

---

\*Correo electrónico: jpachon@hvr.sas.cica.es.



## Introducción histórica

Los modelos experimentales de neumonía bacteriana se han descrito desde antes del uso clínico de las sulfonamidas en 1936<sup>1</sup>. Este modelo se ha empleado para estudios sobre patogenia de la neumonía<sup>2</sup>, la farmacocinética de los antimicrobianos en el pulmón, y para estudiar la eficacia de distintos antimicrobianos en neumonías producidas por distintos agentes<sup>3</sup>. Los primeros modelos de neumonía experimental fueron casi exclusivamente neumonías neumocócicas. Posteriormente, ante el aumento de casos en humanos de neumonías por bacilos gramnegativos y *Staphylococcus aureus*, se desarrollaron modelos experimentales de neumonías causadas por estos microorganismos, incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*<sup>3</sup>, *Klebsiella pneumoniae*<sup>4</sup>, *Legionella pneumophila*<sup>5</sup> y *Haemophilus influenzae*<sup>6</sup>.

Para los modelos experimentales de neumonía bacteriana se han utilizado diversas especies animales, incluyendo perros, cobayas, ratas y ratones. De igual manera, la forma de inoculación ha sido diversa. El modelo de aspiración fue de los primeros en utilizarse, a través de una instilación intratraqueal o intrabronquial<sup>7</sup>. Otros modelos desarrollaron la utilización de aerosoles, en cámaras para tal efecto, para introducir el inóculo en vías respiratorias, lo que facilita la inoculación simultánea de varios animales<sup>8,9</sup>. Un problema en el modelo de neumonía experimental es la dificultad de lograr un modelo reproducible de neumonía mortal. Para ello se han usado varios métodos, el más práctico de los cuales es la mezcla de inóculo con mucina gástrica porcina<sup>1,10</sup>.

Los modelos experimentales de neumonía bacteriana se han utilizado de forma cada vez más frecuente para estudios preclínicos del desarrollo de nuevos antimicrobianos, pero también para la evaluación de la actividad *in vivo* de antimicrobianos antiguos frente a bacterias con distintos mecanismos de resistencia.

## Modelos de neumonía experimental

Entre los modelos experimentales anteriormente especificados, los más frecuentes son los que utilizan ratones, ratas y cobayas. La elección de una especie animal u otra dependerá de las características de la bacteria que se quiere estudiar, que debe producir una infección reproducible y eventualmente fatal, lo que vendrá condicionado por los objetivos del estudio, así como por la farmacocinética de los antimicrobianos

que se utilizarán, por la facilidad del modelo y por el coste. Existen modelos de neumonía aguda y de neumonía crónica.

### Modelos de neumonía aguda

**Descripción del modelo de neumonía en ratones.** Un modelo de neumonía bacteriana experimental frecuentemente empleado es el que utiliza ratones, inmunocompetentes o neutropénicos. El modelo en ratones neutropénicos, mediante la administración de ciclofosfamida, se utiliza cuando se usan bacterias con escasa virulencia para el ratón, con el objetivo de facilitar el establecimiento de la infección. Se detallará un modelo de neumonía por *Acinetobacter baumannii*, reproducible, que produce una mortalidad en el grupo control del 100%<sup>10</sup> y que puede servir de referencia para neumonías experimentales por otros agentes.

Para la producción de neumonía experimental se utiliza una modificación del modelo de Espósito y Pennington<sup>6,7</sup>, utilizando ratones inmunocompetentes C57BL/6, hembras, con peso de 14-16 g. Los animales se anestesian con 15  $\mu$ l de tiopental sódico al 5% intraperitoneal. Una vez anestesiado el animal, se administra el inóculo por vía intratraqueal. Para ello, se suspende al animal verticalmente y con el cuello en hiperextensión. Se canaliza la tráquea por vía oral con una aguja metálica de punta roma conectada a una jeringa Hamilton (Hamilton Co., Reno, NV) conteniendo 50  $\mu$ l del inóculo bacteriano, deslizándola hasta sentir el contacto de la aguja roma con el cartílago traqueal. Se inocula lentamente (2-3 min) para evitar la asfixia y la deglución del inóculo. Al finalizar la inoculación el animal permanece durante 3 min en posición vertical para evitar que el inóculo pase a la vía digestiva o al exterior y posteriormente en decúbito lateral a 30° hasta que despierte.

Se utiliza un inóculo bacteriano de aproximadamente 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colonias (UFC)/ml, preparado a partir de un cultivo en TSB a 37 °C durante 18 h mezclado al 50% con mucina gástrica porcina (M-2378; Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) diluida en suero salino al 10%. Para conocer el tamaño exacto del inóculo empleado, se realizan diluciones seriadas, sembrándose 100  $\mu$ l de cada dilución en placas de agar-sangre e incubándolas 18-24 h a 37 °C.

En otros modelos de neumonía experimental en ratones, la infección se puede producir a través de la instilación intranasal de gérmenes particularmente virulentos<sup>11</sup>.

Tras la infección, en los experimentos para estudiar la eficacia de distintos antimicrobianos, los animales son adscritos a diversos grupos de tratamiento y grupos controles, con la dosificación, intervalos, tiempo de comienzo del tratamiento y duración de éste que más convenga al experimento. Durante éste se evalúa la mortalidad de la infección durante el tiempo prefijado, tanto en el grupo control como en los animales tratados. El tratamiento antimicrobiano en este modelo hay que comenzar a las 4 h tras la inoculación para evitar la mortalidad precoz que se produce en los grupos controles.

Para la realización de estudios farmacocinéticos se realizan extracciones de sangre seriadamente tras la administración de una dosis de los antimicrobianos. Para ello, en el animal anestesiado con 0,1 ml de tiopental sódico al 5 % intraperitoneal se realiza un corte en el plexo periorbitario, extrayéndose aproximadamente 300-500  $\mu$ l de sangre mediante un tubo Microtainer con separador, en la cual se determinarán las tasas de antimicrobianos, calculándose después la  $C_{max}$ , el área bajo la curva concentración/tiempo, la semivida de eliminación ( $t_{1/2}$ ) y el tiempo en que las concentraciones plasmáticas permanecen por encima de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Se utilizan grupos de 3 ratones por cada tiempo de la curva que se desea obtener, que habitualmente consta de 5 a 8 puntos distintos para poder determinar todas las variables farmacocinéticas. Una vez realizadas las extracciones los animales son sacrificados.

Tras finalizar el experimento diseñado, los animales supervivientes son sacrificados 4 h después de la última dosis de antibiótico mediante la administración de 0,2 ml de tiopental sódico al 5 % intraperitoneal. Con técnica aséptica se procede a la apertura torácica a la altura del esternón con tijeras y pinzas estériles, manteniéndose el tórax abierto con un separador. Posteriormente, y mediante una jeringa con aguja subcutánea, se realiza una punción intracardiaca para exanguinar al animal y realizar hemocultivos cualitativos. A continuación se extraen pulmones y corazón en un bloque, procediéndose sobre una placa de Petri estéril a la separación cuidadosa de los pulmones, los cuales se pesan en una balanza de precisión y se homogeneizan (Stomacher Lab-Blender 80, Fisher Sc.) durante 2 min, procediéndose entonces a realizar cultivos cuantitativos mediante diluciones seriadas del líquido del homogeneizado, refiriéndose los resultados como  $\log_{10}$  UFC/g de pulmón. Junto a la mortalidad anteriormente comentada, las variables que se ana-

lizan son el número de pulmones estériles y el aclaramiento bacteriano desde el pulmón.

Grupos de animales pueden ser adscritos para la realización de estudios histopatológicos de los pulmones para comprobar la producción de neumonía experimental y estudiar la celularidad en el tejido pulmonar. Para ello, los pulmones sin homogeneizar se fijan en formaldehído al 10 %, incluyéndose posteriormente en parafina, se seccionan mediante un microtomo y se realizan las tinciones apropiadas.

*Descripción del modelo de neumonía en cobayas.* Otro modelo empleado es el de neumonía en cobayas. Se especifican las fases de este modelo utilizando igualmente como inóculo *A. baumannii*. Se utilizan animales de 350-400 g de peso. Los animales son anestesiados mediante la administración de 100 mg/kg de ketamina por vía intraperitoneal y, además, 0,2 ml de lidocaína al 2 % por vía subcutánea en la región anterior del cuello. La posición del animal una vez anestesiado debe ser en decúbito supino con la cabeza levantada con una inclinación de 30° sobre el plano horizontal. Con el cuello hiperextendido se rasura la región cervical anterior. Posteriormente, mediante técnica aséptica, se practica una incisión en la línea media del cuello de unos 15 mm de longitud, procediéndose a continuación a la disección por planos hasta lograr la exposición de la tráquea del cobaya.

La infección se realiza a través del espacio entre dos anillos traqueales, con aguja de 25 G, instilándose 0,25 ml del inóculo, en 3-4 min, que consiste en una suspensión concentrada mediante centrifugación previa de *A. baumannii* en fase de crecimiento logarítmico (cultivo previo durante 4 h en caldo de Mueller-Hinton), mezclada al 50 % con una solución de mucina gástrica porcina (M-2378; Sigma Chemical Co., St Louis, Mo.) diluida al 10 % en suero salino. El tamaño del inóculo es de aproximadamente  $10^{10}$  UFC/ml. Posteriormente, se mantiene al animal durante 30-45 s en posición vertical para asegurar la correcta distribución del inóculo a través del tejido pulmonar.

Tras la infección, en los diseños para conocer la eficacia de distintos antimicrobianos, los animales son adscritos a diversos grupos de tratamiento y grupos controles, con la dosificación, intervalos, tiempo de comienzo del tratamiento y duración de éste que más convenga al experimento. Durante éste se anota la mortalidad de la infección durante el tiempo prefijado, tanto en el grupo control como en los animales tratados.

Se pueden realizar extracciones de sangre seriadamente tras la administración de una dosis de los antimicrobianos para el análisis farmacocinético. Para ello, en el animal anestesiado como anteriormente se ha especificado, se realiza una punción cardíaca a través la zona subxifoidea, extrayéndose 0,5-1 ml de sangre para determinar las tasas de antimicrobianos, y se calculan los parámetros farmacocinéticos como se ha mencionado anteriormente. Se utilizan grupos de 3 cobayas por cada tiempo de la curva que se desea obtener, que habitualmente consta de 5 a 8 puntos distintos para poder calcular todas las variables farmacocinéticas.

Tras finalizar el experimento se procede al sacrificio de los animales para el procesamiento de las muestras tisulares, con una inyección letal de pentobarbital intraperitoneal. Con el cobaya en decúbito supino se procede a toracotomía "en coraza", quedando la línea formada por ambas clavículas y articulaciones esternoclaviculares a modo de bisagra. De esta manera permanecen expuestos el corazón, los grandes vasos y ambos pulmones. Entonces se puede proceder a la extracción de hemocultivos mediante punción intracardíaca con aguja de 25 G y aspiración de 1 ml de sangre. Posteriormente se realiza la extracción en bloque del corazón, los grandes vasos y los pulmones. Sobre una gasa o placa de Petri estéril se disecan los tejidos para separar los pulmones íntegramente. Tras pesar los pulmones se homogeneizan (homogeneizador de tejidos, Stomacher 80) y se realizan cultivos cuantitativos, refiriéndose los resultados como  $\log_{10}$  UFC/g de pulmón. Como en el modelo de neumonía en ratones, las variables que se analizarán son la mortalidad, el número de pulmones estériles y el aclaramiento bacteriano desde el pulmón.

### Modelos de neumonía crónica

Se han desarrollado modelos de infección pulmonar crónica, utilizando un inóculo en el cual las bacterias son introducidas dentro de glóbulos de agar, con el objetivo de restringir la fagocitosis y así disminuir el aclaramiento bacteriano del pulmón<sup>12</sup>. Estos modelos fueron descritos originalmente en ratas por Cash et al<sup>13</sup>, comprobándose que *P. aeruginosa* permanecía en los pulmones de las ratas al menos 35 días, mientras que si las bacterias se inoculaban en suspensión libre eran aclaradas casi completamente después de 3 días. Un modelo de neumonía crónica por *P. aeruginosa* y *Burkholderia cepacia* se ha desarrollado también en ratones, persistiendo las bacterias en pulmón a la misma concentración du-

rante 21 días<sup>14</sup>. De igual manera, se ha descrito un modelo en ratas de infección pulmonar crónica por *H. influenzae*<sup>12</sup>, con infección pulmonar hasta 14 días, y con cambios histológicos, así como una respuesta inmunitaria humoral elevada similar a la encontrada en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)<sup>15</sup>. Para el modelo de neumonía crónica por *P. aeruginosa* se ha desarrollado un modelo que incluye las bacterias en glóbulos de alginato, con los mismos resultados que utilizando glóbulos de agar<sup>16</sup>.

### Ventajas y limitaciones del modelo experimental

El modelo de neumonía experimental pertenece a los modelos discriminativos, diseñados para simular la producción de la infección lo más parecida a la que ocurre en seres humanos. Como tal, reúne los criterios ideales de los modelos experimentales discriminativos: a) técnica de infección simple; b) microorganismos causantes, ruta de entrada, diseminación en el organismo y afectación tisular idénticos o muy semejantes a la situación en humanos; c) gravedad, curso y duración de la enfermedad predecibles, reproducibles y analizables, y d) capacidad de medir y reproducir la eficacia del tratamiento antimicrobiano<sup>17</sup>. Desde estos puntos de vista permiten conocer aspectos acerca de la patogenia de la enfermedad, de la farmacocinética y de la tolerancia y eficacia de diversos antimicrobianos, tanto de los nuevos antimicrobianos como de nuevas formas de usar antimicrobianos conocidos. Los resultados obtenidos con este modelo discriminativo permiten diseñar ensayos clínicos en humanos o confirmar observaciones clínicas realizadas en éstos.

Las limitaciones son las derivadas fundamentalmente de la diferente farmacocinética de los antimicrobianos en los animales de experimentación en relación con los seres humanos. Para subsanar esta limitación es preciso realizar estudios farmacocinéticos en los animales para conseguir que las concentraciones plasmáticas e idealmente las pulmonares sean similares a las alcanzadas en humanos<sup>18</sup>. Otra limitación es que el inóculo bacteriano que se utiliza es diferente en tamaño a las microaspiraciones causantes de las neumonías en las personas, al menos en los modelos que producen la infección a través de la instilación intratraqueal o intrabronquial. Por último, los resultados de un experimento pueden cambiar dependiendo de aparentes alteraciones menores en el diseño,

como el uso de diferentes cepas, la fase de crecimiento y el tamaño del inóculo, la edad y el sexo de los animales, así como la dosis, intervalos y vía de administración de los antimicrobianos<sup>18</sup>. Por todos estos factores, los resultados de diferentes investigadores pueden variar. Por todo ello, la aplicación directa de los resultados a las neumonías en seres humanos debe realizarse con precaución o hacerlo tras la realización de los ensayos clínicos.

### **El modelo experimental y el conocimiento de la fisiopatología de la neumonía**

La mayoría de los estudios experimentales en el modelo de neumonía, encaminados a conocer la fisiopatología y la patogenia de la neumonía, han girado alrededor de la neumonía neumocócica. *Streptococcus pneumoniae* es un agente etiológico frecuente, pero el mecanismo de la lesión tisular que produce no está completamente dilucidado. En un modelo de neumonía neumocócica experimental en conejos se comprobó que las preparaciones de la pared celular eran los componentes de *S. pneumoniae* que producían la mayor respuesta inflamatoria<sup>19</sup>. Diversos trabajos que han utilizado el modelo de neumonía experimental han valorado la importancia de la citotoxina multifuncional neumolisina, así como de la autolisina. En un modelo de neumonía en ratas la inyección de neumolisina recombinante en el lóbulo apical producía una neumonía cuya gravedad estaba relacionada con la concentración de neumolisina (800 frente a 200 ng). Además, la neumonía era menos grave si se utilizaba una toxina modificada con actividad hemolítica disminuida, pero no era menor con la inyección de neumolisina con capacidad disminuida de activar el complemento<sup>20</sup>. En el mismo modelo de neumonía lobar en ratas, la inmunización con adyuvante de Freund y neumolisina, así como la estimulación sólo con adyuvante de Freund, redujeron la gravedad de la neumonía causada por instilación de *S. pneumoniae*, sin influir en la incidencia de bacteriemia<sup>21</sup>. En otro modelo de neumonía murina, la infección por cepas de *S. pneumoniae* productoras de neumolisina, comparada con la producida por cepas deficientes en neumolisina, producía una mayor lesión de la barrera alveolocapilar y una mayor concentración de bacterias en pulmón, y contribuía al desarrollo de bacteriemia. Además, la actividad citotóxica y activadora del complemento de la neumolisina pudo contribuir a la lesión pulmonar aguda y al desarrollo de la bacteriemia<sup>22</sup>. Otros autores han comprobado, además, que en este modelo

no existían inflamación ni crecimiento bacteriano en los pulmones si las cepas eran deficitarias en autolisina<sup>11</sup>.

Los modelos de neumonía experimental han puesto de manifiesto la compleja interacción entre la infección y la respuesta inflamatoria del huésped, encaminada a controlarla. En un modelo de neumonía por *L. pneumophila* en cobayas, desarrollado a través de la inhalación de aerosoles, se pudo estudiar la respuesta inmunitaria celular y su relación con la resolución de la neumonía. En el lavado broncoalveolar, durante los primeros 3 días se comprobó un crecimiento exponencial de bacterias, tiempo a partir del cual la inflamación producida por polimorfonucleares limitó el aumento de bacterias, y se siguió de un aumento en el infiltrado por macrófagos, desapareciendo las bacterias de los pulmones a los 11 días<sup>9</sup>. Así mismo, en un modelo de neumonía neumocócica en ratones, se comprobó un aumento importante de polimorfonucleares, respecto de los controles, siguiendo la inoculación intrabronquial<sup>23</sup>. Otros trabajos, en los que se ha utilizado una neumonía experimental en perros, han puesto de manifiesto que la opsonización es necesaria para un aclaramiento adecuado de neumococos del pulmón<sup>24</sup>.

Sin embargo, el proceso de resolución de la neumonía, tanto en modelos agudos como crónicos, resulta complejo. La resolución de la neumonía bacteriana implica un equilibrio delicado entre citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, que influyen en la resolución de la enfermedad a través de la respuesta inflamatoria y en la localización de ésta una vez que la infección está controlada, respectivamente<sup>25</sup>. Por ello, la perturbación experimental de la respuesta inflamatoria puede tener tanto efectos beneficiosos como deletéreos, por lo que es necesario tener cautela en la utilización de medidas inmunoadyuvantes para el tratamiento de la neumonía. A modo de ejemplos, en un modelo de neumonía experimental murina por *K. pneumoniae* se ha demostrado que la administración de G-CSF aumentaba la mortalidad de la neumonía y la multiplicación bacteriana a través de un efecto directo sobre la producción del polisacárido capsular, que sobrepasan la acción reclutadora y estimuladora de los leucocitos por el G-CSF<sup>26</sup>. En cambio, la administración de un anticuerpo monoclonal frente a la cápsula de *Klebsiella* reducía significativamente la multiplicación bacteriana y revertía el aumento de mortalidad inducido por el G-CSF. Por otro lado, en un modelo de neumonía neumocócica en ratas controles y cirróticas, la administración de G-CSF disminuía la mortalidad

en el grupo de ratas controles pero no en las cirróticas<sup>27</sup>.

En otros aspectos, los modelos de neumonía han contribuido a aclarar la fisiopatología de la hipoxemia durante el proceso. En un modelo de neumonía neumocócica en perros, la hipoxemia se debía a la suma del defecto de ventilación por la ocupación del espacio aéreo y de la vasodilatación en la zona del pulmón pobremente ventilado<sup>28</sup>, con el efecto *shunt* consiguiente.

El modelo de infección crónica pulmonar por *P. aeruginosa*<sup>13,14</sup> ha sido utilizado para imitar la infección por estas bacterias en la fibrosis quística. Del mismo modo, el modelo de infección pulmonar crónica por *H. influenzae* presenta cambios histológicos similares a los encontrados en pacientes con EPOC<sup>15</sup>. Estos modelos han sido útiles para estudiar aspectos relacionados con la virulencia de las bacterias, la implicación de las exoenzimas bacterianas en la producción de la lesión pulmonar, la posible utilidad de la vacunación para restringir las exacerbaciones infecciosas, la actividad de las concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos para reducir la lesión pulmonar a través de la inhibición de la liberación de enzimas, y también se ha demostrado que los antiinflamatorios pueden ser efectivos para reducir la lesión pulmonar asociada a la inflamación<sup>12</sup>.

### El modelo experimental en el tratamiento de la neumonía

El modelo de neumonía experimental descrito por Esposito y Pennington fue utilizado por sus autores para la evaluación de la actividad de diversos antimicrobianos en la neumonía por *H. influenzae*, comprobándose que todos los tratamientos disminuían la mortalidad en el mismo grado respecto a los controles no tratados, pero que algunos antimicrobianos eran más activos que otros en el aclaramiento de las bacterias desde el pulmón<sup>6</sup>. Desde entonces múltiples estudios han evaluado la actividad de nuevos antimicrobianos o comparado otros ya existentes, para infecciones por bacterias frecuentemente productoras de neumonías, con o sin problemas de resistencias a antimicrobianos. Entre otros estudios, en la neumonía por *H. influenzae* se ha evaluado la utilidad de enoxacino, ofloxacino y ciprofloxacino en cepas susceptibles y resistentes a ampicilina<sup>29,30</sup>, así como la de ketólidos en desarrollo inicial<sup>31</sup>.

En la neumonía experimental por *P. aeruginosa* se han realizado, entre otros, estudios para valorar el tratamiento combinado de betalactámicos más aminoglucósidos, con resultados en los que se comprueba una mayor eficacia de la combi-

nación<sup>32</sup> o un efecto indiferente<sup>33</sup>. La adición de aerosoles de tobramicina a su administración intramuscular aumentó la erradicación bacteriológica y disminuyó los fenómenos inflamatorios en cobayas<sup>34</sup>. En el modelo en cobayas, agudo y crónico, se demostró la eficacia de determinadas fluoroquinolonas, sin que la adición de betalactámicos o aminoglucósidos aumentara la eficacia<sup>35</sup>, y en el modelo agudo en cobayas se observó la eficacia de imipenem y tobramicina<sup>36</sup>. En modelos por otros bacilos gramnegativos no fermentadores, el modelo de neumonía por *A. baumannii* en ratones neutropénicos ha permitido comprobar el efecto postantibiótico de imipenem *in vivo*<sup>37</sup>.

La neumonía experimental por *S. pneumoniae* se ha utilizado desde la emergencia de cepas resistentes a penicilina, cefalosporinas y macrólidos, para la valoración de la actividad *in vivo* de diferentes antimicrobianos. Así, se ha podido demostrar la eficacia de la penicilina en ratas inmunocompetentes para cepas con CMI de 2 µg/ml<sup>38</sup>, de amoxicilina a altas dosis frente a cepas con CMI de hasta 4 µg/ml<sup>39</sup>, aumentándose la eficacia de amoxicilina al asociar ácido clavulánico<sup>40</sup>. En estudios comparativos con cefalosporinas, la amoxicilina a altas dosis ha sido más eficaz que la cefotaxima con una cepa resistente a penicilina y cefotaxima (CMI 4 µg/ml)<sup>41</sup>, mientras que la penicilina a altas dosis ha sido igual que cefotaxima y cefpiroma utilizando una cepa con CMI de penicilina de 2 µg/ml<sup>42</sup>. La ceftriaxona, en un modelo de ratón neutropénico, ha sido más eficaz que amoxicilina para una cepa con CMI de amoxicilina de 2 µg/ml y sensible a ceftriaxona, y que la cefotaxima para una cepa resistente a ambas cefalosporinas (CMI 4 µg/ml), lo que se ha relacionado con un mayor tiempo por encima de la CMI para la ceftriaxona<sup>43,44</sup>. El modelo en cobayas también ha comprobado que el meropenem es igual de eficaz que la amoxicilina y la cefotaxima usando una cepa de neumococo con CMI de penicilina de 1 µg/ml<sup>45</sup>. En cuanto a tratamientos asociados, la combinación de gentamicina y amoxicilina fue más eficaz que la monoterapia con esta última en un modelo de ratón neutropénico usando una cepa con CMI de amoxicilina de 4 µg/ml<sup>46</sup>. Por último, en un modelo de neumonía en ratones inmunocompetentes y neutropénicos usando diferentes cepas de neumococo, el trovafloxacino fue tan eficaz como amoxicilina a altas dosis, salvo en cepas resistentes y tolerantes, en las que fue superior el trovafloxacino; sin embargo, sólo la amoxicilina fue eficaz con una cepa resistente a quinolonas<sup>47</sup>. En general, todos estos estudios refieren la eficacia

de las penicilinas a altas dosis, cuando la CMI no excede los 2-4 µg/ml, con las diferencias derivadas del tipo de animal, las dosis empleadas y el diseño del estudio. En modelos de neumonía neumocócica, la teicoplanina ha sido eficaz en ratas inmunocompetentes y neutropénicas<sup>38</sup>, y la vancomicina en ratas inmunocompetentes<sup>42</sup>.

## BIBLIOGRAFÍA

- Nungester WJ, Jourdonais LF. Mucin as an aid in the experimental production of lobar pneumonia. *J Infect Dis* 1936; 59: 258-265.
- Wood WB Jr. Studies on the mechanism of recovery in pneumococcal pneumonia. I. The action of type-specific antibody upon the pulmonary lesions of experimental pneumonia. *J Exp Med* 1941; 73: 201-222.
- Pennington JE. Use of animals models to evaluate antimicrobial therapy for bacterial pneumonia. En: Zak O, Sande MA, editores. *Experimental models in antimicrobial chemotherapy*. Londres: Academic Press, 1986; 237-256.
- Nishi T, Tsuchiya K. Therapeutic effects of cefotiam and cefazolin on experimental pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 18: 549-556.
- Fraser DW, Bopp C, Wachsmuth IK, Feeley JC, Tsai TF. Antibiotic treatment of guinea pigs infected with agent of Ledionnaires' disease. *Lancet* 1978; 1: 175-178.
- Esposito AL, Pennington JE. Experimental pneumonia due to *Haemophilus influenzae*: observations on pathogenesis and treatment. *J Infect Dis* 1984; 149: 728-734.
- Esposito AL, Pennington JE. Effects of aging on antibacterial mechanisms in experimental pneumonia. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128: 662-667.
- Laurenzi GA, Berman L, First M, Kass EH. A quantitative study of the deposition and clearance of bacteria in the murine lung. *J Clin Invest* 1964; 43: 759-768.
- Davis GS, Winn WC Jr., Gump DW, Beaty HN. The kinetics of early inflammatory events during experimental pneumonia due to *Legionella pneumophila* in guinea pigs. *J Infect Dis* 1983; 148: 823-835.
- Rodríguez Hernández MJ, Pichardo C, Cuberos L, Caballero FJ, Moreno I, Becerril B et al. Efficacy of imipenem, doxycycline and amikacin in experimental murine pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii*. Berlin: 9th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 21-24 de marzo de 1999; 335.
- Canvin JR, Marvin AP, Sivakumaran M, Paton JC, Boulnois GJ, Andrew PW et al. The role of pneumolysin and autolysin in the pathology of pneumonia and septicemia in mice infected with a type 2 pneumococcus. *J Infect Dis* 1995; 172: 119-123.
- O'Reilly. Relevance of animal models for chronic bacterial airway infections in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 2.101-2.108.
- Cash HA, Woods DE, McCullough B, Johanson WG, Bass JA. A rat model of chronic respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Am Rev Respir Dis* 1979; 119: 453-459.
- Starke JR, Edwards MS, Langston C, Baker CJ. A mouse model of chronic pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia*. *Pediatr Res* 1987; 22: 698-702.
- Slater LN. A rat model of prolonged pulmonary infection due to nontypable *Haemophilus influenzae*. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 1.429-1.435.
- Pedersen SS, Shand GH, Hansen BL, Hansen GN. Induction of experimental chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection with *P. aeruginosa* entrapped in alginate microspheres. *APMIS* 1990; 98: 203-211.
- Zak O. Scope and limitations of experimental chemotherapy. *Experientia* 1980; 36: 479-483.
- Wilson R, Rayner C. Animals models of respiratory infections. *J Antimicrob Chemother* 1994; 33: 381-383.
- Tuomanen E, Rich R, Zak O. Induction of pulmonary inflammation by components of the pneumococcal cell surface. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 869-874.
- Feldman C, Munro NC, Jeffery PK, Mitchell TJ, Andrew PW, Boulnois GJ et al. Pneumolysin induces the salient histologic features of pneumococcal infection in the rat lung in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 5: 416-423.
- Roberts P, Jeffery PK, Mitchell TJ, Andrew PW, Boulnois GJ, Feldman C et al. Effect of immunization with Freund's adjuvant and pneumolysin on histologic features of pneumococcal infection in the rat lung in vivo. *Infect Immun* 1992; 60: 4.969-4.972.
- Rubins JB, Charboneau D, Paton JC, Mitchell TJ, Andrew-PW, Janoff EN. Dual function of pneumolysin in the early pathogenesis of murine pneumococcal pneumonia. *J Clin Invest* 1995; 95: 142-150.
- Vial WC, Toews GB, Pierce AK. Early pulmonary granulocyte recruitment in response to *Streptococcus pneumoniae*. *Am Rev Respir Dis* 1984; 129: 87-91.
- Guckian JC, Christensen GD, Fine DP. The role of opsonins in recovery from experimental pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 1980; 142: 175-190.
- Moore TA, Standiford TJ. The role of cytokines in bacterial pneumonia: an inflammatory balancing act. *Proc Assoc Am Physicians* 1998; 110: 297-305.
- Held TK, Mielke ME, Chedid M, Unger M, Trautmann M, Huhn D et al. Granulocyte colony-stimulating factor worsens the outcome of experimental *Klebsiella pneumoniae* pneumonia through direct interaction with the bacteria. *Blood* 1998; 91: 2.525-2.535.
- Preheim LC, Snitily MU, Gentry MJ. Effects of granulocyte colony-stimulating factor in cirrhotic rats with pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 1996; 174: 225-228.

28. Light RB, Mink SN, Cooligan TG, Wood LD. The physiology of recovery in experimental pneumococcal pneumonia. *Clin Invest Med* 1983; 6: 147-151.
29. Kemmerich B, Borner K, Pennington JE. Comparative evaluation of enoxacin, ofloxacin, ampicillin, and chloramphenicol for treatment of experimental *Haemophilus influenzae* pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 417-420.
30. Kemmerich B, Borner K, Pennington JE. Comparative efficacies of ciprofloxacin, ampicillin and chloramphenicol in treatment of experimental *Haemophilus influenzae* pneumonia. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20: 77-83.
31. Piper KE, Rouse MS, Steckelberg JM, Wilson WR, Patel R. Ketolide treatment of *Haemophilus influenzae* experimental pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 708-710.
32. Rusnak MG, Drake TA, Hackbarth CJ, Sande-MA. Single versus combination antibiotic therapy for pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa* in neutropenic guinea pigs. *J Infect Dis* 1984; 149: 980-985.
33. Pennington JE, Stone RM. Comparison of antibiotic regimens for treatment of experimental pneumonia due to *Pseudomonas*. *J Infect Dis* 1979; 140: 881-889.
34. Makhoul IR, Merzbach D, Lichtig C, Berant M. Antibiotic treatment of experimental *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in guinea pigs: comparison of aerosol and systemic administration. *J Infect Dis* 1993; 168: 1.296-1.299.
35. Kemmerich B, Small GJ, Pennington JE. Comparative evaluation of ciprofloxacin, enoxacin, and ofloxacin in experimental *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 29: 395-399.
36. Pennington JE, Johnson CE. Comparative activities of N-formimidoyl thienamycin, ticarcillin, and tobramycin against experimental *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 22: 406-408.
37. Joly-Guillou ML, Wolff M, Pocardalo JJ, Walker F, Carbon C. Use of a new mouse model of *Acinetobacter baumannii* pneumonia to evaluate the post-antibiotic effect of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 345-351.
38. Candiani G, Abbondi M, Borgonovi M, Williams R. Experimental lobar pneumonia due to penicillin-susceptible and penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in immunocompetent and neutropenic rats: efficacy of penicillin and teicoplanin treatment. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39: 199-207.
39. Woodnutt G, Berry V. Efficacy of high-dose amoxicillin-clavulanate against experimental respiratory tract infections caused by strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 35-40.
40. Smith GM, Slocombe B, Abbott KH, Mizen LW. Activity of amoxicillin-clavulanate against penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in an experimental respiratory infection model in rats. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 813-817.
41. Moine P, Sauve C, Vallee E, Bedos JP, Azoulay-Dupuis E. *In vivo* efficacy of cefotaxime and amoxicillin against penicillin-susceptible, penicillin-resistant and penicillin-cephalosporin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* in a mouse pneumonia model. *Clin Microbiol Infect* 1997; 3: 608-615.
42. Gavalda J, Capdevila JA, Almirante B, Otero J, Ruiz I, Laguarda M et al. Treatment of experimental pneumonia due to penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in immunocompetent rats. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 795-801.
43. Moine P, Vallee E, Azoulay-Dupuis E, Bourget P, Bedos JP, Bauchet J et al. *In vivo* efficacy of a broad-spectrum cephalosporin, ceftriaxone, against penicillin-susceptible and -resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* in a mouse pneumonia model. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 1.953-1.958.
44. Dauve C, Azoulay-Dupuis E, Moine P, Darras-Joly C, Rieux V, Carbon C et al. Efficacies of cefotaxime and ceftriaxone in a mouse model of pneumonia induced by two penicillin- and cephalosporin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2.829-2.834.
45. Ponte C, Parra A, Nieto E, Soriano F. Development of experimental pneumonia by infection with penicillin-insensitive *Streptococcus pneumoniae* in guinea pigs and their treatment with amoxicillin, cefotaxime, and meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2.698-2.702.
46. Darras-Joly C, Bedos JP, Sauve C, Moine P, Callee E, Carbon C et al. Synergy between amoxicillin and gentamicin in combination against highly penicillin-resistant and -tolerant strain of *Streptococcus pneumoniae* in a mouse pneumonia model. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2.147-2.151.
47. Bedos JP, Rieux V, Bauchet J, Muffat-Joly M, Carbon C, Azoulay-Dupuis E. Efficacy of trovafloxacin against penicillin-susceptible and multiresistant strains of *Streptococcus pneumoniae* in a mouse pneumonia model. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 862-867.

## DISCUSIÓN

A. PASCUAL: ¿Existe algún modelo experimental de neumonía asociada a ventilación mecánica? Y, en segundo lugar, en vuestro modelo con *Acinetobacter*, ¿la tasa de curación espontánea es elevada?

J. PACHÓN: No lo conozco ni he leído sobre la existencia de un modelo con ventilación mecánica en la bibliografía que he revisado. En cuanto a la segunda pregunta, en el modelo en ratón no existe curación espontánea; comienza la mor-

talidad a las 12 h y en el plazo de 72 h es del 100 %.

A. GIMÉNEZ: Si no he entendido mal, para estudios de farmacocinética se utiliza la toma de muestras por la vía del plexo retroorbitario en el ratón y la punción cardíaca en el cobaya. Según las normativas catalanas, no se podrían emplear estas vías si los animales se tuvieran que recuperar. ¿Vosotros recuperáis estos animales?

J. PACHÓN: No, el animal no se recupera. En el modelo con ratón hay que sacrificarlo porque las lesiones que se le han causado harían que sufriera al despertarse. En el cobaya, como se extrae una cantidad de sangre de entre 1,5 y 2 ml, preferimos no utilizarlos posteriormente porque se introduciría una variable distinta.

J. CANTÓ: ¿La elección del modelo de ratón C57BL/6 se debe a que habéis comprobado mejores resultados que con otras líneas de animales consanguíneos o incluso no consanguíneos, o es simplemente una cuestión de disponibilidad? Lo pregunto porque los servicios de experimentación animal nos encontramos a menudo con el problema del empleo de un determinado modelo por parte de un investigador sin que exista una estricta necesidad de que sea aquél el único modelo a utilizar. En estos casos se puede complicar considerablemente el funcionamiento de estos servicios.

J. PACHÓN: La elección de este animal obedece a dos razones. Por un lado, es el animal con el que aprendemos el modelo y, por otro, se trata de un animal de fácil disponibilidad para nosotros. Su precio, que es ciertamente elevado, se ha conseguido abaratar hasta un 30 % gracias a la reciente inauguración de un centro de producción de animales de experimentación para la Universidad de Sevilla. Sin embargo, probablemente con otra cepa de ratón se pueda producir igualmente el modelo.

M. CUENCA-ESTRELLA: Una gran parte de la metodología que se utiliza en la pulmonía bacteriana se emplea también para las aspergilosis pulmonares. La introducción del inóculo de *Aspergillus fumigatus* se ha realizado también en el interior de lentejas de agarosa para intentar cronificar la infección, aunque no he leído nada sobre el empleo de mucina gástrica. ¿Cuál es la justificación para utilizar mucina gástrica en vuestro modelo experimental?

J. PACHÓN: En el modelo de ratón la mucina gástrica acentúa la mortalidad del animal. Si con el inóculo bacteriano únicamente obteníamos una mortalidad de alrededor del 70 %, con la mucina gástrica, que se utiliza también en el modelo de neumonía neumocócica y en modelos intra-

peritoneales de infección sistémica, se obtiene una mortalidad del 100 %. La mucina parece ser que inicialmente inhibe la fagocitosis, pero no cronifica el modelo ni es lesiva por sí misma. Se trata de una sustancia natural y así lo comprobamos en animales a los que inoculamos únicamente mucina gástrica y observamos que se recuperaban, sin producir ningún tipo de lesión pulmonar que pudiera explicar su efecto sobre la mortalidad. Tampoco aumenta el crecimiento de la bacteria *in vitro*.

J. ARIZA: Sin ser, ni mucho menos, entendido en estos temas, tengo la impresión de que existe una considerable dispersión de opiniones y resultados en este modelo experimental. Después de haber oído las exposiciones anteriores y la tuya ahora, no sé si realmente los modelos se tienen que asemejar el máximo al modelo humano o no. Por un lado, podemos entender que sí, pero por otro, a veces se inducen situaciones extremas para que el modelo sea factible o para analizar aspectos concretos que están bastante alejados de lo que realmente ocurre en la práctica clínica. Esta reflexión se puede aplicar también a la farmacocinética de los antibióticos, dado que en modelos con ratón ésta no tiene nada que ver con la farmacocinética humana. Por tanto, es todo una amalgama en la que creo que es casi imposible extraer conclusiones. Tal vez convendría uniformizar toda la información algo confusa que deriva de la bibliografía con este modelo, o plantearse la elección de otros modelos experimentales con menos problemas al respecto. Tal vez la farmacocinética humanizada en estos ratones podría ser una alternativa a tener en cuenta.

J. PACHÓN: Ya lo hemos comentado muchas veces y tienes toda la razón en que la dispersión de resultados es muy importante y a su vez de difícil justificación. Si bien se trata de una limitación del modelo probablemente irresoluble, en mi opinión no invalida las conclusiones que se puedan extraer, ya que los factores que pueden sesgar los resultados inciden en mayor o menor medida, pero de igual forma, sobre la farmacocinética de los distintos antimicrobianos en un mismo animal.

V. AUSINA: Abundando en el tema y tratándose de un patógeno encapsulado como el neumococo, considero que un inóculo de  $10^8$ - $10^{10}$  aplicado directamente a parénquima pulmonar es un inóculo exagerado. ¿Se podría utilizar un inóculo menor o la vía de aerosol en este tipo de modelo?

J. PACHÓN: En otros modelos de neumonía con neumococo el inóculo puede ser algo inferior



pero, para cepas resistentes a penicilina, además de un elevado inóculo se requiere utilizar ratón neutropénico. Si no recuerdo mal, también se ha empleado el modelo con rata inmunocompetente.

A. PAHISA: Incidiendo en el tema de la patogenia, hemos hallado que en ratas inmunocompetentes el neumococo era totalmente aclarado. En cierta ocasión Claude Carbon nos comentó que trabajan con ratón neutropénico porque con ratón inmunocompetente no pueden reproducir los efectos patógenos. ¿Sabes si este problema se ha descrito en otros patógenos y si existen sustancias para intentar incrementar esta patogenia?

J. PACHÓN: Todos los trabajos de neumonía neumocócica del grupo de Carbon se han realizado en animales neutropénicos. En infección por *Acinetobacter* también ocurre con tipo distinto de ratón, en el que tuvieron que inducir neutropenia para que fuera patógeno. Preferimos emplear la mucina gástrica porcina para no inducir una neutropenia, dado que la mayoría de neumonías por *Acinetobacter* no ocurren en pacientes neutropénicos.

J. LIÑARES: ¿Utilizáis la cepa de *Acinetobacter baumannii* especialmente por sus características de virulencia o bien cualquier cepa con la mucina gástrica es capaz de producir la neumonía?

J. PACHÓN: En este momento estamos trabajando con un modelo en cobaya para estudiar los antimicrobianos que no se pueden utilizar en el ratón y empleamos dos cepas diferentes de *Acinetobacter* que producen igualmente neumonía.

J. GAVALDÀ: El comentario de Javier Ariza es la crítica que, con una gran racionalidad, se hace habitualmente a los modelos experimentales de enfermedades infecciosas. Un ejemplo claro de la disparidad de protocolos es el modelo de neumonía. A mi entender, creo que hay que diferenciar dos tipos de estudios: el estudio de

farmacodinamia y el estudio de eficacia terapéutica. En el estudio de farmacodinamia se utiliza una gran diversidad de dosis, porque lo que se pretende estudiar básicamente son los patrones de eficacia de los diferentes antibióticos, o por qué un antibiótico es más eficaz que otro. En el estudio de la eficacia terapéutica comparto contigo la opinión de que deberían existir unos requerimientos mínimos de farmacocinética deseables: la concentración máxima del antibiótico debería ser la misma que en humanos a la dosis habitual utilizada y, además, sería recomendable que el intervalo de dosificación se acercara al máximo a su relación con la semivida del fármaco. Por ejemplo, en nuestro estudio de neumonía por neumococo altamente resistente en rata pudimos comprobar la diferencia de eficacia entre vancomicina y betalactámicos porque éstos se administraban cada 2-3 h y la vancomicina, por su semivida en la rata, se debía administrar cada 8 h. Éste sería uno de los puntos a tener en cuenta, sobre todo cuando se comparan antibióticos de diferentes familias. Por otro lado y enlazando con la pregunta de Vicenç Ausina sobre el tema del inóculo, se cree que todo es "aceptable" si la evolución y las características histológicas de la enfermedad en el animal se parecen al máximo a lo que ocurre en humanos. Por tanto, es evidente que debemos utilizar inóculos más altos por lo que decíamos antes de que la inmunidad en los animales es mucho mayor y, si no, no habría manera de reproducir la infección en el animal. Para finalizar, me gustaría comentar que en el seno del grupo europeo de modelos experimentales de infección existe una propuesta de intentar sentar unas bases o requisitos mínimos a cumplir los diferentes modelos animales existentes, con el fin de que los estudios sean comparables entre sí y para que sean aceptados por las respectivas agencias del medicamento en la obtención de los registros de nuevos fármacos.

---

# Modelo de infecciones por cuerpo extraño

---

Josep Anton Capdevila<sup>a,\*</sup>, Álvaro Pascual<sup>b</sup> y Antonio Sitges-Serra<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitari de la Vall d'Hebron. Barcelona. <sup>b</sup>Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Sevilla. <sup>c</sup>Departamento de Cirugía. Hospital del Mar. Barcelona.

---

## RESUMEN

El conocimiento de la fisiopatología, prevención y tratamiento de las infecciones protésicas necesita del concurso de modelos animales de infección en los que se puedan controlar las diversas variables que influyen en la interacción múltiple entre el material extraño, el organismo infectante, el antimicrobiano y el ser humano. Estos modelos deben completarse con estudios *ex vivo* que analicen el comportamiento del agente infectante en presencia del cuerpo extraño, puesto que las habituales correlaciones entre los parámetros farmacocinéticos y la eficacia de los antibióticos *in vivo* no se mantienen cuando existe un cuerpo extraño. De todos los modelos, por su simpleza, bajo coste económico y reproducibilidad, el de la cápsula subcutánea ha sido el más utilizado. No obstante, la aplicabilidad de sus resultados a la clínica sólo es factible si se emplean animales con mecanismos inmunológicos y de cicatrización semejantes a los humanos, si se tienen en cuenta las diferencias farmacocinéticas entre especies y si la propensión a la infección es similar.

### Palabras clave:

Modelo experimental. Cuerpo extraño. Profilaxis.

---

## FOREIGN BODY INFECTION MODEL

Animal models of foreign body infection are necessary to study the *in vivo* interactions between prosthetic materials, microorganisms and antibiotics.

The usual correlations between pharmacokinetic parameters and the effect of antibiotics *in vivo* seem not to hold when a foreign body is present. Since, the animal experimentation should be completed with *in vitro* studies taking account of the interactions between microorganisms and biomaterials.

Of all models described, the tissue cage model is the most useful for its reproducibility and low economic cost. However, to apply its results in human pathology needs that the immunologic mechanisms, healing characteristics and pharmacokinetics parameters of animals employed were similar to humans.

### Key words:

Experimental model. Foreign body. Prophylaxis.

---

---

## Introducción

En las últimas décadas, el avance de la medicina ha comportado un uso cada vez más frecuente de materiales ajenos al organismo para la colocación de todo tipo de prótesis mecánicas, plastias reconstructivas, catéteres y sondas, entre otros dispositivos no biológicos<sup>1</sup>. Esto ha significado recuperar la funcionalidad de diferentes sistemas y órganos lesionados, pero ha generado

una no despreciable morbimortalidad asociada, debido principalmente a la aparición de complicaciones infecciosas<sup>2,3</sup>.

Se calcula que entre un 0 y un 7 % de las prótesis cardíacas, entre un 0,2 y un 0,4 % de las prótesis totales de cadera, entre un 2 y un 24 % de los *shunts* derivados de líquido cefalorraquídeo, entre un 4 y un 8 % de los catéteres intraperitoneales y entre un 0,2 y un 10 % de los catéteres intravasculares se infectan. La infección

---

\*Correo electrónico: janton@hg.vhebron.es.

de la prótesis suele comportar la pérdida de su función mecánica y en ocasiones pone en peligro la integridad anatómica y la vida del paciente<sup>4,5</sup>.

Las infecciones debidas a contaminación del material protésico tienen algunas características comunes: *a)* un bajo inóculo inicial de microorganismos<sup>6</sup>; *b)* una evolución clínica solapada<sup>7</sup>; *c)* la localización de la infección exclusivamente en la zona afectada<sup>8</sup>, y *d)* la persistencia de la infección hasta la retirada del cuerpo extraño a pesar de un tratamiento antibiótico adecuado.

Estas características diferenciales y la necesidad de conocer la fisiopatología de las infecciones de cuerpo extraño han motivado el desarrollo de diversas líneas de investigación sobre diferentes modelos experimentales de infección<sup>9</sup>.

Dado que no todas las prótesis, ni todos los diferentes materiales empleados en su construcción, presentan la misma propensión a infectarse, y teniendo en cuenta las peculiaridades propias de cada paciente con diferentes enfermedades de base<sup>10,11</sup>, y las diversas localizaciones anatómicas de las prótesis, es comprensible que se hayan desarrollado múltiples modelos de infección en el animal de experimentación<sup>9</sup>.

Como característica común y diferencial de los modelos de infección por cuerpo extraño, se encuentra el hecho de que en los mismos existe una nueva variable a estudio, como es la interacción mecánica y biológica que se produce entre el material protésico y el ser vivo. En otros modelos de infección se estudia la relación entre el microorganismo infectante y el animal. Sin embargo, cuando existe un cuerpo extraño infectado, hay que tener en cuenta cómo modifica la presencia de este material ajeno, tanto el comportamiento defensivo del hospedador como la virulencia del agente infectante<sup>12,13</sup>. Los modelos animales de infección por cuerpo extraño permiten analizar los cambios fisiopatológicos producidos como consecuencia de la presencia del material ajeno al organismo y efectuar estudios de profilaxis y tratamiento de infecciones en presencia de este material. Además, los estudios *in vitro* de sensibilidad antibiótica, farmacocinética y farmacodinamia que apoyan el modelo experimental deben realizarse teniendo en cuenta las modificaciones de las condiciones biológicas habituales debidas a la presencia del material extraño.

En esta revisión se expondrán los modelos de infección por cuerpo extraño que históricamente han sido más relevantes, nos centraremos en las aportaciones del modelo de la "cápsula subcutánea" (*tissue cage*) y, finalmente, se expondrá un modelo de infección de catéter intravascular.

## Modelos históricos de infección por cuerpo extraño

La historia de esta línea de investigación va paralela a la introducción del material plástico en medicina<sup>14</sup>, desde su uso inicial como sutura en cirugía general, a la progresiva utilización más especializada en cirugía vascular, cardíaca, ortopédica y neurocirugía.

### Modelo de sutura

Éste es un modelo sencillo que simula la infección de herida quirúrgica. Se ha aplicado con diferentes materiales de sutura, tanto en el ratón, como en el perro y el cobaya. Se basa en el concepto general de que el aumento de la propensión a la infección a causa de la presencia de un material extraño se debe a la reacción inflamatoria previa que causa este material<sup>15,16</sup>. Existen diferencias entre los diversos experimentos en cuanto al inóculo y el momento de producir la infección.

Este modelo ha contribuido a conocer mejor los factores de riesgo y la prevención de la infección de herida quirúrgica: las suturas monofilamento se infectan menos que las trenzadas, las suturas sintéticas no absorbibles (nylon o polipropileno) favorecen menos la infección que los materiales naturales no absorbibles (seda o algodón) y las suturas sintéticas absorbibles (ácido poliglicólico) potencian menos la infección que los materiales naturales absorbibles como el catgut. Los modelos de infección de herida quirúrgica han sido, así mismo, muy útiles para el estudio de las mallas protésicas muy utilizadas en cirugía general.

### Modelo de injerto vascular

Es un modelo que requiere de una complejidad quirúrgica no despreciable. El perro es el animal utilizado habitualmente en estos experimentos<sup>17</sup>, tanto por consideraciones anatómicas como por su semejanza con los humanos en cuanto a las características de cicatrización de los injertos vasculares<sup>18</sup>. Otros animales propuestos, como el cerdo, el ternero y el mandril, presentan la característica diferencial con los humanos de que endotelizan la prótesis rápidamente. Por el contrario, el perro tiene el inconveniente de presentar frecuentemente bacteriemias que su sistema reticuloendotelial no aclara y, por tanto, una mayor facilidad para la infección espontánea de los implantes vasculares<sup>19</sup>.

Este modelo ha permitido analizar aspectos como las características de la cicatrización<sup>18</sup>, la

influencia de la integridad de la falsa íntima en la predisposición a la infección<sup>19</sup>, la influencia del tipo de material, del inóculo y del intervalo postoperatorio en el desarrollo de la infección<sup>20</sup>, el papel de la colonización por vía hematógena<sup>19,21</sup>, diversas complicaciones clínicas y problemas diagnósticos<sup>22,23</sup> y el papel de la profilaxis y de diferentes pautas antibióticas terapéuticas<sup>22</sup>.

#### *Modelo de endocarditis protésica*

Los modelos de endocarditis producidos a partir de la lesión valvular causada por un catéter serán objeto de otro artículo de esta monografía. La sustitución valvular cardíaca por prótesis mecánicas o biológicas susceptibles de infectarse precisa de modelos experimentales complejos.

Grogan et al<sup>24</sup> desarrollaron en 1980 un modelo de endocarditis protésica tricúspide utilizando el ternero como animal de experimentación. En el modelo de endocarditis precoz, la infección se produce en el mismo acto operatorio, inyectando entre  $10^2$  y  $10^3$  unidades formadoras de colonias (UFC)/ml de *Staphylococcus aureus* en el anillo de anclaje de la prótesis. En el modelo tardío, se administra un inóculo superior a  $10^7$  UFC/ml por vía hematógena, lográndose un 100% de infecciones. Éste es un modelo caro y difícil de realizar, pero permite estudiar la fisiopatología de la endocarditis protésica, comparar la calidad de diferentes materiales, valorar pautas de tratamiento y profilaxis, a la vez que observar la interacción entre la sangre y la superficie protésica.

#### *Modelo de rodilla protésica*

Existen diferentes modelos difíciles de extraer en humanos, pero que en conjunto aportan datos sobre la conveniencia de ciertos materiales, cementos antibióticos y otros tipos de profilaxis<sup>25,26</sup>.

#### *Modelo de infección de cuerpo extraño intraperitoneal*

Este modelo consiste en insertar, dentro de la cavidad peritoneal de la rata, uno o varios fragmentos de plástico, habitualmente catéteres de silicona de un diámetro de 0,9 cm y una longitud de 1,5 cm<sup>27</sup>. La infección se provoca instilando dentro de la cavidad peritoneal 1 ml de una suspensión salina que contiene *Staphylococcus aureus*, a los 10-15 min de la intervención. Seguidamente, a varios intervalos de tiempo, los animales son sometidos a repetidos lavados pe-

ritoneales bajo anestesia. El líquido aspirado es cultivado cuantitativamente. Finalmente, el animal es sacrificado y se realizan hemocultivos, cultivo del absceso peritoneal pericatóter y cultivo cuantitativo del lavado del catéter tras su suspensión en 1 ml de suero salino y posterior agitación en vórtex durante 10 s.

La infectividad depende del inóculo. Con inóculos bajos, la rata es capaz de eliminar la bacteria de la cavidad peritoneal al cabo de 72 h. Inóculos de  $5 \times 10^8$  UFC/ml de *S. aureus* causan una elevada mortalidad, por lo que el inóculo estándar utilizado es de  $5 \times 10^6$  UFC/ml.

Este modelo permite realizar experimentos de profilaxis y tratamiento. En los estudios terapéuticos se comprueba de nuevo la persistencia de la infección en el cuerpo extraño a pesar de obtener una concentración de antibiótico en el foco infeccioso superior en tres-cuatro veces la concentración mínima inhibitoria (CMI) del microorganismo. Se demuestra una vez más que no existe una correlación directa entre los parámetros farmacocinéticos y el efecto *in vivo* de la metilicina y la gentamicina en las infecciones por cuerpo extraño. La presencia del *biofilm* puede proteger a la bacteria de la acción los antibióticos<sup>28</sup>.

#### **Modelo de la cápsula subcutánea**

Es un modelo sencillo consistente en la implantación quirúrgica de un tubo de plástico en el tejido subcutáneo del animal<sup>29-31</sup>. Se han utilizado cilindros de plexiglas (polimetilmetacrilato) o de Teflón (tetrafluoroetileno) con un diámetro externo entre 10 y 12 mm, y una longitud aproximada de 30 mm. Estos cilindros deben estar perforados en toda su superficie por agujeros de 1 mm de diámetro distribuidos de forma regular. La técnica quirúrgica es muy simple. Consiste en implantar en el flanco del animal de experimentación (conejos, perros o ratas) el cilindro de plástico. Tras anestesiarse al animal y rasurar la zona a utilizar, se realiza una incisión con técnica estéril. Se disecciona la grasa subcutánea creando una cavidad para alojar la cápsula. Una vez colocado el cilindro, se sutura la piel. Se pueden implantar uno o varios cilindros por animal.

Como reacción inflamatoria a cuerpo extraño, el organismo secreta líquido intersticial que se acumula en el interior del cilindro<sup>32</sup>. La presencia de los agujeros permite realizar aspiraciones periódicas de este líquido, analizar su composición bioquímica y celular a lo largo del tiempo, producir infecciones instilando inóculos en su interior y estudiar la farmacocinética tisular de

los antibióticos administrados por vía sistémica. Hay que tener la precaución de rasurar y esterilizar la piel que se va a puncionar para evitar contaminaciones indeseadas del contenido de la cápsula.

Los experimentos deben iniciarse al cabo de 2 semanas de la intervención para permitir la formación de un tejido de granulación estéril y la acumulación de exudado inflamatorio en el interior de la cápsula.

Zimmerli et al<sup>9,29</sup> han descrito la composición del líquido acumulado en el interior de la cápsula a lo largo del tiempo (desde 15 a 86 días). Para completar los estudios farmacocinéticos o para disponer de una referencia plasmática se realizan punciones cardíacas.

#### *Aportaciones del modelo de la cápsula subcutánea*

*Estudios de la fisiopatología de la reacción inflamatoria frente a un cuerpo extraño.* Ya han sido comentados.

*Estudios de farmacocinética y distribución tisular de antibióticos aplicables para ensayos de profilaxis y terapéutica*<sup>33-38</sup>. Se ha estudiado el papel de la rifampicina, vancomicina, penicilinas isoxazólicas, cefalosporinas y otros antibióticos, como profilaxis y tratamiento de la infección protésica por *S. aureus* y *S. epidermidis*. La evaluación de los resultados se realiza mediante cultivo cuantitativo del exudado aspirado del interior de la cápsula y la valoración de la infección "adherida" al plástico, mediante cultivo del material extraño tras su exéresis. El procesamiento de la cápsula incluye su sonicado tras lavado y aspiración del contenido, siendo opcional un tratamiento adicional con tripsina con la finalidad de obtener el mayor número posible de bacterias adheridas y/o incluidas en el tejido de granulación<sup>39</sup>. El análisis periódico del líquido del interior de la cápsula permite monitorizar la infección y las concentraciones antibióticas en el foco infeccioso. Estos experimentos han permitido comprobar cómo la infección de la cápsula persiste a pesar de la esterilización de su contenido. Además, las bacterias recuperadas tras el cultivo de la cápsula tuvieron un aumento considerable de su concentración mínima bactericida (CMB).

*Estudios del riesgo de colonización por vía hematógena de las prótesis extravasculares*<sup>26</sup>. Estos experimentos consisten en provocar una bacteriemia al animal portador de una cápsula subcutánea y analizar la posterior infección de la misma. Estos

estudios sugieren la utilidad de la profilaxis antibiótica en pacientes con material protésico extravascular que van a ser sometidos a procedimientos invasivos con riesgo de bacteriemia.

*Estudios de la biocompatibilidad y facilidad a la infección de diferentes materiales*<sup>40</sup>. Consiste en comparar el grado de inflamación y la propensión a la infección entre varias cápsulas fabricadas con materiales diferentes. Las cápsulas de cerámica producen una mayor inflamación que las de Teflón, y son 10 veces más susceptibles a la infección.

El modelo de infección de la cápsula subcutánea es muy sencillo, económico y de fácil aplicabilidad. No obstante, presenta varios inconvenientes a la hora de extrapolar los resultados obtenidos a los humanos. En primer lugar, los mecanismos inflamatorios defensivos no son completamente iguales entre especies<sup>18</sup>. En este sentido, para experimentos que valoran la predisposición a la infección debido a la presencia de un cuerpo extraño, se prefiere utilizar el cobaya<sup>12,13,25</sup>. Para experimentos de farmacocinética antibiótica este animal no es apropiado.

Además, este modelo no tiene en cuenta las posibles interacciones mecánicas y biológicas que se producen cuando la prótesis está colocada en el interior del torrente sanguíneo o realiza una función dinámica.

#### **Modelo de infección de catéter intravascular**

La infección por catéter intravascular es una de las principales causas de infección nosocomial que va en aumento debido al mayor uso que se hace a diario de los catéteres tanto para fines diagnósticos como terapéuticos<sup>41,42</sup>. La infección por catéter comporta un considerable morbimortalidad y un incremento del gasto sanitario no despreciable. En España se calcula que una bacteriemia por catéter representa un coste adicional de medio millón de pesetas<sup>43</sup>.

La prevención de esta infección es el objetivo a alcanzar. En este sentido, existen una serie de normas bien establecidas para el manejo de los catéteres con la finalidad de minimizar el riesgo de infección<sup>44</sup>. Paralelamente, se han diseñado diversas estrategias en cuanto a la manufactura, diseño y composición de los catéteres que tratan de dificultar la colonización y posterior desarrollo de la infección<sup>45-48</sup>.

Los microorganismos anidan en la vaina de fibrina que se forma en el extremo distal del catéter. Las bacterias alcanzan esta situación mayoritariamente por progresión endoluminal a partir de

contaminaciones iniciales de la conexión, o por migración exoluminal pericatóter a partir de la piel<sup>49-51</sup>. El conocimiento de esta fisiopatología es esencial a la hora de diseñar estrategias de diagnóstico y prevención de la infección de catéter.

El tratamiento de la bacteriemia por catéter implicaba la retirada sistemática del cuerpo extraño infectado para curar la infección. No obstante, en los últimos años se ha comprobado que no siempre es imprescindible retirar el catéter para curar la infección<sup>42,52</sup>. Este planteamiento conservador es de gran interés en los pacientes que precisan mantener la vía, como son los pacientes con nutrición parenteral domiciliaria, los sometidos a hemodiálisis periódica o los pacientes oncohematológicos.

El tratamiento de la sepsis por catéter manteniendo el catéter tiene por objetivos tratar la bacteriemia y esterilizar el catéter<sup>52,53</sup>. Basándose en los conocimientos adquiridos sobre la dificultad de erradicar los microorganismos adheridos a las superficies de plástico<sup>29</sup>, el éxito en la esterilización del catéter dependerá de que seamos capaces de exponer el microorganismo causal a concentraciones elevadas de antibiótico durante un período prolongado de tiempo. Estos dos objetivos pueden conseguirse con el *antibiotic-lock*<sup>53</sup>. Esta forma de administrar el antibiótico consiste en llenar y cerrar el catéter con el fármaco deseado por el período de tiempo en que el catéter no va a ser utilizado. Con esta estrategia se consigue una elevada eficacia local sin toxicidades sistémicas. No obstante, quedan varios puntos por aclarar, como: ¿qué papel tiene la heparina como fármaco adyuvante en la erradicación de la infección?, ¿cuál es el mejor antibiótico a utilizar?, ¿cuál debe ser la duración del *antibiotic-lock*?, ¿pueden tratarse de esta manera todos los microorganismos?, ¿es independiente la eficacia terapéutica de la composición química del catéter?, entre otros.

Éstos y otros interrogantes han motivado el desarrollo de un modelo experimental que sirva de banco de pruebas. En este sentido existen modelos *ex vivo*<sup>54</sup> que permiten analizar algunos componentes de la infección de catéter, pero que no tienen en cuenta los mecanismos defensivos del huésped ni el efecto del flujo vascular sobre la patogenicidad de esta infección.

#### *Descripción de un modelo animal de infección de catéter*

En la bibliografía existen escasos trabajos en los que se haya utilizado un modelo animal de sepsis por catéter. Además, los animales utiliza-

dos son de diferentes especies, los catéteres difieren en cuanto a su composición y los microorganismos utilizados son distintos<sup>54-56</sup>.

Sitges-Serra et al diseñaron un modelo de sepsis por catéter en el conejo<sup>54,55</sup>. En este modelo la infección se establece a partir de producir una contaminación del interior de la conexión.

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo similar de sepsis por catéter en el que la infección se consigue mediante el relleno del catéter con un caldo de cultivo que contiene el inóculo bacteriano (mecanismo fisiopatológico endoluminal). El modelo consiste en colocar mediante disección anatómica, un catéter de silastic en la vena yugular externa del conejo, cuyo extremo distal se aloja en la vena cava inferior.

#### *1. Estandarización del modelo*

Se utilizan conejos machos blancos Nueva Zelanda con un peso aproximado entre 2 y 2,1 kg, a los que se coloca un catéter venoso central de silicona (Vygon® 1,2 mm interior/2,00 mm exterior) por vía yugular.

##### *a) Inserción del catéter*

La técnica consiste en disecar la vena yugular derecha tras anestesia general (inyección i.m. de 5 mg/kg de ketamina y 1 mg/kg de xilacina). Por una pequeña incisión en la zona lateral del cuello se pone a plano la vena yugular común y se aísla de la circulación venosa mediante ligadura proximal (seda 000). A través de una pequeña incisión se coloca el catéter, avanzando en dirección distal 8 cm hasta alojarse en la vena cava inferior. El catéter se fija a la vena yugular. Posteriormente el catéter se tuneliza a través del tejido subcutáneo del animal, exteriorizándolo en la región dorsal. De este modo se consigue una mejor fijación del catéter, lo que dificulta el acceso del animal al mismo. Durante todo el proceso de inserción del catéter, éste está cebado con suero fisiológico para evitar aspiraciones gaseosas y la formación de trombos. La técnica de inserción del catéter se efectuará en un quirófano de cirugía experimental con la máxima asepsia, teniendo especial cuidado en la esterilidad del catéter y en la desinfección de la piel en el punto de entrada del catéter.

##### *b) Producción de la sepsis por catéter*

Inmediatamente tras la inserción el catéter se procederá a su infección. La técnica consistirá en

cebar el catéter con 0,5 ml de caldo Mueller-Hinton que contenga  $10^8$  UFC/ml de *S. aureus*. Esta solución se deja en contacto con el catéter durante 18 h, momento en el que se retira, se comprueba la infección del catéter mediante la práctica de hemocultivos cuantitativos<sup>57</sup> (transcatéter y periféricos), y se inician las pautas terapéuticas.

2. Evaluación de los resultados

Para la evaluación de los resultados en este modelo de sepsis por catéter y poder efectuar comparaciones entre el grupo control y los diversos grupos terapéuticos realizamos las siguientes técnicas microbiológicas:

- a) Hemocultivos cuantitativos (técnica de Shöttmueller) pretratamiento<sup>57</sup>.
- b) Hemocultivos cuantitativos (técnica de Shöttmueller) presacrificio.
- c) Cultivo de la superficie exoluminal del catéter (2 cm distales) sobre una placa de agar (técnica de Maki<sup>58</sup>). Se considera un resultado positivo si el recuento de UFC es superior a 14.
- d) Cultivo de la superficie endoluminal del catéter mediante cultivo cuantitativo del lavado del interior del catéter con 2 ml de caldo de Mueller-Hinton (técnica de Liñares modificada<sup>50</sup>).
- e) Cultivo cuantitativo global del catéter tras sonicado del mismo en un baño con caldo de Mueller-Hinton a 50 Hz durante 10 min (técnica de Sheretz modificada<sup>59</sup>).

Los resultados de las técnicas cuantitativas se expresan como el logaritmo decimal del número de UFC/ml. En la tabla I se exponen los resultados obtenidos a las 18 y a las 48 h de la infección. El modelo a las 18 h presenta una menor mortalidad y, como el nivel de infección alcanzado es similar al obtenido a las 48 h, hemos deci-

dido utilizar este modelo de infección a las 18 h para nuestros estudios terapéuticos.

Este modelo de infección de catéter por *S. aureus* ha permitido estudiar hasta la fecha alguno de estos puntos: el papel de la heparina y su interacción *in vivo* con los antibióticos en el tratamiento local del catéter infectado<sup>60</sup>, valorar la eficacia de diversas pautas terapéuticas administradas localmente mediante la técnica del *antibiotic-lock* y evaluar la aparición de resistencias cuando se administra rifampicina a dosis elevadas (3.000 µg/ml) durante diversos intervalos de tiempo<sup>61</sup>.

**Ensayos *in vitro* predictores de la eficacia antibiótica en las infecciones relacionadas con cuerpo extraño**

La elección de un tratamiento antibiótico se basa en su actividad *in vitro* (CMI) y en sus características farmacocinéticas. En el tratamiento de una infección protésica estos condicionantes no son suficientes, puesto que frecuentemente la infección persiste a pesar de un tratamiento apropiado durante un tiempo prolongado. Por tanto, es necesario realizar tests *in vitro* que predigan mejor la evolución del tratamiento antibiótico, teniendo en cuenta lo que sucede habitualmente en las infecciones de cuerpo extraño. En esta situación, las bacterias se hallan en una fase estacionaria de crecimiento<sup>62</sup>, con lo que su sensibilidad frente a los antibióticos es menor, y además están adheridas al plástico, y englobadas en un magma de fibrina y tejido de granulación que dificulta la actividad de los antibióticos<sup>62,63</sup>. Los estafilococos pueden secretar además una sustancia mucoide, glicocálix o *slime*, que los envuelve obstaculizando aún más la acción de los antimicrobianos. La simple determinación de la CMI no

TABLA I  
RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACIÓN DE UN MODELO *IN VIVO* DE INFECCIÓN DE CATÉTER. INFECCIÓN ENDOLUMINAL CON 0,7 ml DE UNA SUSPENSIÓN DE *S. AUREUS* A  $10^8$  UFC/ml

Tiempo <sup>a</sup>	Muertos/total	Rodaje <sup>b</sup>	HCC/HCP <sup>c</sup>	Lavado <sup>d</sup>	Sonicado <sup>e</sup>
18	0/10	10/10	10/10	4,1 ± 1,2	4,5 ± 1,1
48	2/10	8/8	8/8	4,0 ± 1,5	4,1 ± 1,3

UFC: unidades formadoras de colonias.

<sup>a</sup>Tiempo en horas desde la infección al sacrificio.

<sup>b</sup>Técnica de Maki; número de positivos (> 100 UFC/ml)/número total.

<sup>c</sup>Número de UFC/ml en el hemocultivo cuantitativo transcatéter (HCC) dividido por el número de UFC/ml en el hemocultivo cuantitativo periférico (HCP) superior a cuatro veces.

<sup>d</sup>Resultado expresado como media ± desviación estándar del logaritmo decimal del número total de UFC recuperadas.

predice la evolución de la infección de un cuerpo extraño, donde las bacterias están en fase estacionaria y adheridas.

En este sentido, es interesante la aportación de Ramírez de Arellano et al<sup>64</sup> sobre la actividad de los antimicrobianos sobre biocapas de bacterias adheridas a catéteres de plástico. El método consiste, esencialmente, en la formación de biocapas de *Staphylococcus epidermidis* sobre catéteres de polivinilo. Para ello se desarrollan las biocapas en condiciones estáticas, incubando 50 segmentos de catéter en tubos que contienen 50 ml de caldo de Mueller-Hinton inoculado con *S. epidermidis* (10<sup>5</sup> UFC/ml). Los segmentos de catéteres se incuban 6,24 y 48 h a 37 °C.

El número de bacterias adheridas durante cada período de incubación se determina lavando tres veces un segmento de catéter con tampón fosfato frío (phosphate buffer sodium [PBS]) y estéril (pH = 7,2-7,4). Posteriormente se deposita cada segmento en un tubo que contiene 2 m de PBS, se sonica durante 1 min en un baño de sonicación a 45 kHz (Ultrasons, Selecta), y se agita en vórtex durante 15 s. A continuación se diluye el contenido del tubo y se siembran 10 µl en placa de agar de Mueller-Hinton para el recuento tras la incubación durante 24 h a 37 °C.

Simultáneamente, se determina la CMI de las cepas por el método de microdilución utilizando dos tipos de inóculos: bacterias adheridas a segmentos de cloruro de polivinilo (PVC) y bacterias en suspensión. En el primer caso, el inóculo utilizado fueron catéteres de polivinilo sobre los que se había formado una biocapa. Transcurrido el período de adherencia se lavan los segmentos de polivinilo dos veces en PBS frío y estéril, y se depositan en los pocillos de la placa de microdilución que previamente se han preparado con caldo de Mueller-Hinton suplementado con cationes y diferentes diluciones de antimicrobianos. Paralelamente se determina la CMI de los antimicrobianos para las bacterias en suspensión siguiendo la normativa del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). En este caso se utiliza un inóculo bacteriano similar al número de bacterias que se adhieren a los segmentos de polivinilo. Se considera la CMI de la biocapa bacteriana como la menor concentración de antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible macroscópicamente en el pocillo. Para determinar la CMB de la biocapa bacteriana, se lavan dos veces con PBS los segmentos de catéter de los pocillos en los que no había crecimiento visible, se sonica y se agita en vórtex cada uno de los segmentos. Finalmente, se siembran 10 µl en placa de agar de Mueller-Hinton para su re-

cuento. La CMB se define como la menor concentración de antimicrobiano capaz de acabar con el 99,9 % del inóculo inicial.

Con esta metodología, Ramírez de Arellano et al<sup>64</sup> comprueban que las biocapas bacterianas sobre polivinilo son más resistentes a la actividad bactericida de los antimicrobianos, y cómo sólo determinadas asociaciones de antibióticos son capaces de esterilizar la superficie del biomaterial. La producción de *slime* no es el único mecanismo implicado<sup>61-65</sup>. Con una metodología similar se ha observado que la CMI de determinados antimicrobianos (carbapenémicos) frente a bacilos gramnegativos se incrementa extraordinariamente en presencia de determinados plásticos (látex silicizado). Este fenómeno se debe a alteraciones en las proteínas de la membrana externa bacteriana (porinas) inducidas por alguno de los componentes del biomaterial plástico aún por determinar<sup>66</sup>.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ingraham FD, Alexander E Jr, Matson DD. Synthetic plastic materials in surgery. *N Engl J Med* 1947; 236: 362-368.
2. Fry WJ, Lindenauer SM. Infection complicating the use of plastic arterial implants. *Arch Surg* 1967; 94: 600-609.
3. Dougherty SH, Simmons RC. Infections in bionic man: the pathobiology of infections in prosthetic devices. *Curr Probl Surg* 1982; 19: 219-239.
4. Bucholtz HW, Elson RA, Engelbrecht E, Lodenkämper H, Röttger J, Siegel A. Management of deep infection of total hip replacement. *J Bone Joint Surg* 1981; 63B: 614-618.
5. Widmer A. Intravenous-related infections. En: Wenzel RP, editor. *Prevention and control of nosocomial infections* (3<sup>rd</sup> ed.). Baltimore: Williams and Wilkins, 1997; 771-806.
6. Lidwell OM, Lowbury EJJ, White W, Blowers R, Stanley SJ, Lowe D. Effect of ultraclean air in operating room on deep sepsis in the joint after total hip replacement: a randomized study. *Br J Med* 1982; 285: 10-14.
7. Fitzgerald RH Jr, Nolan DR, Elstrup DM, Van Scoy RE, Washington II Jr., Coventry MB. Deep wound sepsis following total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg* 1977; 59A: 847-855.
8. Hunter G, Dandy D. The natural history of the patient with an infected total hip replacement. *J Bone Joint Surg* 1977; 59B: 293-297.
9. Zimmerli W, Waldvogel FA. Models of foreign-body infections. En: Zak O, Sande MA, editores. *Experimental models in antimicrobial chemotherapy*. Londres: Academic Press, 1986; 295-318.
10. Rayfield EJ, Ault MJ, Keusch GT, Brothers MJ, Nechemias C, Smith H. Infection and diabetes: the



- case for glucose control. *Am J Med* 1982; 72: 439-450.
11. Van der Meer JWM. Defects in host defense mechanisms. En: Rubin RH, Young LS, editores. *Clinical approach to infection in the compromised host* (3ª ed.). Nueva York: Plenum Medical Book Company, 1994; 33-66.
  12. Zimmerli W, Waldvogel FA, Vadaux P, Nydegger UE. Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model. *J Infect Dis* 1982; 146: 487-497.
  13. Zimmerli W, Lew PD, Waldvogel FA. Pathogenesis of foreign body infection: evidence for a local granulocyte defect. *J Clin Invest* 1984; 73: 303-310.
  14. Wipple AO. The use of silk in the repair of clean wounds. *An Surg* 1933; 98: 662-671.
  15. Eleck SD, Conen PE. The virulence of *Staphylococcus pyogenes* for man. *Br J Exp Pathol* 1957; 38: 573-586.
  16. James RC, McLeod CJ. Induction of staphylococcal infections in mice with small inocula introduced on sutures. *Br J Exp Pathol* 1961; 42: 266-277.
  17. Moore WS. Experimental studies relating to sepsis in prosthetic vascular grafting. En: Duma RJ, editor. *Infections of prosthetic heart valves and vascular grafts*. Baltimore: University Park Press, 1977; 267-285.
  18. Sauvage LR, Berger KE, Wood J, Yates SG, Smith JC, Mansfield PB. Interspecies healing of porous arterial prosthesis. *Arch Surg* 1974; 109: 698-705.
  19. Malone JM, Moore WS, Campagna GC, Beam B. Bacteremic infectability of vascular grafts: the influence of pseudointimal integrity and duration of graft function. *Surgery* 1975; 78: 211-216.
  20. Weber TR, Lindenauer SM, Miller TA, Salles CA, Ramsberg S, Gleich P. Focal Infection of aortofemoral prostheses. *Surgery* 1976; 79: 310-312.
  21. Busuttill RW, Rees W, Baker D, Wilson SE. Pathogenesis of aortoduodenal fistula: experimental and clinical correlates. *Surgery* 1979; 85: 1-13.
  22. Rutledge R, Burnham SJ, Johnson G Jr. The use of animal models in studying vascular graft infection. En: Zak O, Sande MA, editores. *Experimental models in antimicrobial chemotherapy*. Londres: Academic Press, 1986; 285-294.
  23. Serota AI, Williams RA, Rose JG, Wilson SE. Uptake of radiolabeled leukocytes in prosthetic graft infection. *Surgery* 1981; 90: 35-40.
  24. Grogan EL, Sande MA, Clark RE, Nolan SP. Experimental endocarditis in calf after tricuspid valve replacement. *Ann Thorac Surg* 1980; 30: 64-69.
  25. Blomberg G, Lindgren U. Late hematogenous infection in total joint replacement. *Clin Orthop* 1981; 155: 244-248.
  26. Zimmerli W, Zak O, Vosbeck K. Experimental hematogenous infection subcutaneously implanted foreign bodies. *Scand J Infect* 1985; 17: 303-310.
  27. Espersen F, Frimodt-Moller, N, Corneliussen L, Thamdrup Rosdhal V, Skinhoj P. Experimental foreign body infection in mice. *J Am Coll Cardiol* 1993; 31 (Supl D): 103-111.
  28. Costerson JW, Geesey GC, Cheng KJ. How bacteria stick. *Sci Am* 1978; 238: 86-95.
  29. Zimmerli W, Vaudaux P, Waldvogel FA, Nydegger UE. Foreign body infection: description of an animal model. *Clin Res* 1981; 29: 399A.
  30. Carbon C, Chau NP, Contrepois A, Lamotte-Barillon S. Tissue cage experiments with beta-lactam antibiotics in rabbits. *Scand J Infect Dis* 1978; (Supl 14): 127-134.
  31. Bergan T. Pharmacokinetics of tissue penetration of antibiotics. *Rev Infect Dis* 1981; 3: 45-66.
  32. Eickenberg HU. What is interstitial fluid? Biochemical and physiological analysis of fluid obtained from tissue cages. *Scand J Infec Dis* 1978; (Supl 14): 166-170.
  33. Tshetu K, Zimmerli W, Waldvogel FA. Short-term rifampin administration in the prevention/eradication of foreign body infection. *Rev Infect Dis* 1983; 5 (Supl 3): 474-480.
  34. Chuard C, Hermann M, Vadaux P, Waldvogel FA, Lew DP. Successful therapy of experimental chronic foreign body infection due to methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by antimicrobial combinations. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 2.611-2.616.
  35. Fasching CE, Peterson LR, Moody JA, Sinn LM, Gerding DN. Treatment evaluation of experimental staphylococcal infections: comparison of beta-lactams, lipopeptide, and glycopeptide antimicrobial therapy. *J Lab clin Med* 1990; 116: 697-706.
  36. Moody JA, Fasching CE, Sinn LM, Gerding DN, Peterson LR. Comparative efficacy of cefoperazone, cefoperazone plus sulbactam, ciprofloxacin, clindamycin, metronidazole, and penicillin G against anaerobic bacteria in an animal model. *J Lab Clin Invest* 1990; 115: 190-195.
  37. Schaad HJ, Chuard C, Vadaux P, Waldvogel FA, Lew DP. Teicoplanin alone or combined with rifampin compared with vancomycin for prophylaxis of experimental foreign-body infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 1.703-1.710.
  38. Zimmerli W, Frei R, Widmer AF, Rajacic Z. Microbiological tests to predict treatment outcome in experimental device-related infections due to *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1994; 33: 959-967.
  39. O'Reilly T, Cleeland R, Squires EL. Evaluation of antimicrobials in experimental animal infections. En: Lorian V, editor. *Antibiotics in laboratory medicine* (4ª ed.). Baltimore: Williams and Wilkins, 1991; 604-765.
  40. Widmer AF, Ochsner PE, Zimmerli W. Biocompatibility and resistance to infections of Teflon and ceramic (TCP) implants in guinea pigs [resumen B238]. Washington DC: Program and Abstracts of the Ninety-Second annual Meeting of the American Society for Microbiology, New Orleans 1992. American Society for Microbiology, 1992; 65.
  41. Henderson DK. Bacteremia due to percutaneous intravascular devices. En: Mandell GL, Bennett JE,

- Dolin R, editores. Principles and practice of infectious diseases. Nueva York: Churchill Livingstone, 1995; 2:587-2.599.
42. Capdevila JA. Catheter-related infection: an update on diagnosis, treatment, and prevention. *Int J Infect Dis* 1998; 2: 230-236.
  43. Moris de la Tassa J, Fernández P, Antuña A, Gutiérrez MC, De la Fuente B, Cortón JA. Estudio de los costes asociados a la bacteriemia relacionada con el catéter. *Rev Clin Esp* 1998; 198: 641-646.
  44. Pearson ML. Guideline for the Prevention of intravascular device-related infections. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996; 17: 438-473.
  45. Raad II, Hohn DC, Gilbreath J, Suleiman N, Hill LA, Brusco P et al. Prevention of central venous catheter-related infections by using maximal sterile barrier precautions during insertion. *Inf Control Hosp Epidemiol* 1994; 15: 231-238.
  46. Maki D, Stolz SM, Wheeler S, Mermel LA. Prevention of central venous catheter-related bloodstream infection by use of an antiseptic-impregnated catheter. *Ann Intern Med* 1997; 127: 257-267.
  47. Raad I, Darouiche R, Hachem R, Sacilowski M, Bodey GP. Antibiotics and prevention of microbial colonization of catheters. *Ant Agents Chemother* 1995; 39: 2.397-2.400.
  48. Segura M, Álvarez F, Tellado JM, Jiménez-Farreres J, Oms L, Rello J et al. A clinical trial on the prevention of catheter-related sepsis using a new hub model. *Ann Surg* 1996; 223: 363-369.
  49. Maki DG. Pathogenesis, prevention and management of infections due to intravascular devices used for infusion therapy. En: Bisno AL, Waldvogel FA, editores. *Infections associated with indwelling medical devices*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1989; 161-177.
  50. Liñares J, Sitges-Serra A, Garau J, Pérez JL, Martín R. Pathogenesis of catheter sepsis: a prospective study with quantitative and semiquantitative cultures of catheter hub and segments. *J Clin Microbiol* 1985; 21: 357-360.
  51. Moro ML, Franco E, Cozzi A. The central venous catheter-related infections study group. Risk factors for central venous catheter-related infections in surgical and intensive care patients. *Inf Control Hosp Epidemiol* 1994; 15: 253-264.
  52. Capdevila JA, Segarra A, Planes AM, Ramírez de Arellano M, Pahissa A, Piera L et al. Successful treatment of haemodialysis catheter-related sepsis without catheter removal. *Nephrol Dial Transplant* 1993; 8: 231-234.
  53. Capdevila JA, Gavalda J, Pahissa A. Antibiotic-lock technique: its usefulness and its controversies. *Antimicrob Infect Dis Newsl* 1996; 15: 9-13.
  54. Segura M, Alia C, Valverde J, Franch G, Torres Rodríguez JM, Sitges-Serra A. Assessment of a new hub design and the semiquantitative catheter culture method using an *in vivo* model of catheter sepsis. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2.551-2.554.
  55. Pérez Sáenz JL. Bases microbiológicas para el tratamiento de la sepsis asociada a catéteres [tesis doctoral]. Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 1990.
  56. Patrick CC, Hetherington SV, Roberson PK, Henwick S, Sloas MM. Comparative virulence of *Staphylococcus epidermidis* isolates in a murine catheter model. *Pediatr Res* 1995; 37: 70-74.
  57. Capdevila JA, Planes AM, Palomar M, Gasser I, Almirante B, Pahissa A et al. Value of differential quantitative blood cultures in the diagnosis of catheter-related sepsis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11: 403-407.
  58. Maki DG, Weise CE, Serafin HW. A semiquantitative culture for identifying intravenous catheter-related infection. *N Engl J Med* 1977; 296: 1.305-1.309.
  59. Sherez RJ, Raad II, Balani A. Three-year experience with sonicated vascular catheter cultures in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 76-82.
  60. Capdevila JA, Gavalda J, Laguarda M, López P, Pahissa A. Evaluation of antibacterial activity of sodium heparin (H) in the treatment of experimental catheter-related infection (CRI) due to *Staphylococcus aureus* (SA) using the antibiotic-lock technique (ALT) [póster B-101]. En: American Society for Microbiology, editores. Abstract book of 37th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Toronto: ICAAC, 1997; 44.
  61. Capdevila JA, Gavalda J, López P, Borrell N, Fortea J, Pahissa A. Efficacy of Rifampin (R) in the treatment of experimental *Staphylococcus aureus* catheter-related infection (CRI) using the antibiotic-lock technique (ALT) [póster B-71a]. En: American Society for Microbiology, editores. Abstract book of 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Diego: ICAAC, 1998; 65.
  62. Proctor RA, Kahl B, Von Eiff Ch, Vadaux PE, Lew DP, Peters G. Staphylococcal small colony variants have novel mechanisms for antibiotic resistance. *Clin Infect Dis* 1998; 27 (Supl 1): 68-74.
  63. Pascual A, Ramírez de Arellano E, Perea EJ. Activity of glycopeptides in combination with amikacin or rifampin against *Staphylococcus epidermidis* biofilms on plastic catheters. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 515-517.
  64. Ramírez de Arellano E, Pascual A, Martínez-Martínez L, Perea EJ. Actividad de antimicrobianos en biocapas de *Staphylococcus epidermidis* sobre catéteres de cloruro de polivinilo. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1995; 13: 581-586.
  65. Ramírez-Ronda CH, Fuxench-Chiesa ZZ. *Ex vivo* models for studying adherence of bacteria/fungi to host tissues. En: Zak O, Sande MA, editores. *Experimental models in antimicrobial chemotherapy*. Londres: Academic Press, 1986; 33-54.
  66. Martínez L, Pascual A, Conejo MC, Picabea L, Perea EJ. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem induced by eluates from siliconized latex urinary catheters is related to outer membrane protein alterations. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 397-399.

## DISCUSIÓN

E.M. TARGARONA: Como cirujano interesado en la infección quirúrgica, me gustaría introducir dos precisiones desde el punto de vista de la práctica clínica. Una se refiere a la clasificación de los modelos de infección por cuerpo extraño; habitualmente nosotros separamos claramente las prótesis subcutáneas u óseas, sea una prótesis de rodilla, una placa, una malla para sustitución de la pared abdominal, donde el problema es la contaminación peroperatoria, de lo que son los cuerpos extraños intravasculares, como puede ser un catéter, donde existe una fisiopatología propia derivada de su manipulación para la perfusión parenteral. La segunda precisión que me gustaría incluir hace referencia al creciente interés en los últimos años por la utilización de mallas sintéticas con el fin de paliar el problema de la infección quirúrgica. Esto ha conllevado la realización de numerosos estudios para valorar tanto la integración tisular de estos biomateriales como la prevención de infecciones, mediante la adición de diferentes soluciones, como por ejemplo de sales argentícas, a la constitución de la malla. Se trata de datos con directa aplicación clínica y que se basan en modelos experimentales que han sido de mucha utilidad y a su vez técnicamente muy sencillos.

J.L. RODRÍGUEZ TUDELA: ¿Cómo se consigue estandarizar el inóculo adherido al catéter vascular?

J.A. CAPDEVILA: Se incuban pedazos de catéter con un caldo de cultivo y se dejan a diferentes intervalos de 16, 24 o 48 h. Nosotros lo efectuamos a las 24 h, posteriormente se lavan con tampón fosfato y se sonica el catéter para obtener el inóculo de bacterias adheridas a éste. El día del experimento disponemos de esta información previa y sabemos el número de bacterias que tendremos adheridas al catéter. Una vez lavado el trozo de catéter obtenemos la CMI.

A. PASCUAL: Me gustaría resaltar la importancia que tienen aquí los estudios *in vitro*, particularmente si los comparamos con otros modelos experimentales de infección. Si nos fijamos en los estándares que tiene que cumplir cualquier material que se va a utilizar en biomedicina, es decir, la realización de estudios exhaustivos de biocompatibilidad, de citotoxicidad, etc., es, sin embargo, curiosa la inexistencia de pruebas de adherencia bacteriana o de pruebas de interacción con los mecanismos de defensa, a pesar de que la infección es la complicación más frecuente y costosa del uso de estos materiales. A menudo la importancia del material emplea-

do se deja un poco en segundo plano, cuando las diferencias entre un tipo de material y otro son importantes. En el mundo de la ortopedia, por ejemplo, las bacterias en general se adhieren mucho más al acero inoxidable que a cualquier otra aleación de titanio u otro metal. En el plástico, en general, los bacilos gramnegativos se adhieren muchísimo más a un látex siliconizado que a un poliuretano o PVC. Incluso algunos materiales *per se* son tóxicos para la función del propio sistema inmune, como es el caso del látex siliconizado o el acero inoxidable que alteran la función bactericida de los polimorfonucleares. Y, finalmente, un aspecto novedoso que nos hemos encontrado en parte por casualidad, es la existencia de algunas bacterias, concretamente *Pseudomonas aeruginosa*, que al estar en contacto con sondas urinarias de látex se hacen resistentes a determinados antibióticos. No me refiero ya al aumento de CMI, sino que la CMI, concretamente de carbapenémicos, aumenta 16 o 32 veces. Parece ser que la bacteria adquiere resistencia por un mecanismo intrínseco, concretamente mediante la desaparición de una proteína de membrana externa o la aparición de una nueva. Es decir, que las bacterias, en contacto con un plástico, se hacen resistentes a los antibióticos porque ese plástico libera alguna sustancia, todavía por identificar, y sobre la que estamos trabajando. Esto podría explicar parcialmente por qué es tan difícil curar con antibióticos determinadas infecciones asociadas a materiales o a cuerpo extraño.

J. ARIZA: Creo que al discutir el tema de las bacterias adherentes y de la dificultad de curación de las infecciones por cuerpos extraños, debemos considerar un triángulo de variables: a) ¿de qué cuerpo extraño estamos hablando? No es lo mismo curar una infección de prótesis, una infección vascular o una infección de malla; b) ¿qué antibiótico utilizamos y cómo se comportan los diferentes antibióticos ante estas situaciones?, y c) ¿de qué microorganismos se trata?, no tanto porque va a requerir un nuevo antibiótico, sino porque el propio microorganismo tampoco se comporta de la misma forma. A partir de estos puntos habría añadir una serie de cuestiones: al hablar de bacterias adherentes, nos referimos exclusivamente a *Staphylococcus aureus*, ¿existe en la bibliografía información respecto al comportamiento de bacterias adherentes gramnegativas? He llegado a la conclusión de que ante *S. aureus*, la ri-

fampicina sería el único antibiótico a destacar, puesto que esa adherencia no modifica de forma importante su capacidad antibiótica; este criterio, ¿se puede aplicar en bacilos gramnegativos y quinolonas? Me gustaría obtener una respuesta a todas estas preguntas, puesto que son las incógnitas que hay que resolver en la práctica clínica del día a día. Para la resolución de las infecciones de cuerpos extraños los médicos deberíamos tener criterios muy claros. Por otro lado, y como última reflexión, parece que existe cierta disociación entre lo que se publica respecto a la sensibilidad de los estafilococos a la rifampicina y lo que ocurre en nuestros hospitales. No sé si esto se debe a problemas en el laboratorio al estudiar el comportamiento de la rifampicina *in vitro*, pero es un punto que tampoco acabo de entender.

A. PASCUAL: Me encantaría poder contestar a todas estas preguntas de Javier Ariza, pero por desgracia nos movemos en un mundo extraordinariamente complejo. Sobre el tema de los bacilos gramnegativos, en estudios *in vitro* muchos se comportan igual que los estafilococos, formando biocapas que se hacen extraordinariamente resistentes. En *Pseudomonas* está muy bien establecido, se conoce y se sabe que es muy difícil de erradicar sólo con el uso de antimicrobianos. El problema está en que, por complicarlo aún más, los biomateriales se comportan de manera muy distinta, incluso en términos de efectos de los antibióticos; es decir, la actividad de un antibiótico en una biocapa bacteriana no va a ser igual en la superficie de PVC que en una superficie de poliuretano; por lo menos lo que nuestros estudios *in vitro* demuestran es que hay determinados plásticos en que el antibiótico actúa de manera más eficaz, posiblemente por la propia constitución de la biocapa. Se trata, sin embargo, de estudios *in vitro*, con todas las limitaciones que ello conlleva. Es un mundo muy complejo en el que intervienen infinidad de factores que son complicados de analizar de una forma independiente. Es obvio que se requieren más modelos experimentales que nos permitan resolver tantas incógnitas. En cuanto a la rifampicina, y si te he entendido correctamente, no tenemos ningún tipo de problema en determinar su sensibilidad *in vitro* en nuestro laboratorio.

J.A. CAPDEVILA: Nosotros, en cuanto a la rifampicina, hemos hecho algunas biocapas. No tenemos toda la batería hecha pero ya observamos que aumenta la CMB pero no tanto como ocurre en proporción con la vancomicina, pero lo que sucede es que con rifampicina partimos de

unos niveles de sensibilidad muy bajos y conseguimos unas concentraciones muy altas en el catéter y, probablemente, esto sea muy favorable desde el punto de vista terapéutico, a pesar de que pueda aumentar un poco la CMB por el hecho de estar adheridas formando biocapas. Y, además, si realizamos el experimento manteniendo 3 mg de rifampicina en el interior del catéter durante 72 h, no aparece ninguna cepa resistente como ocurría a las 24 h. Probablemente esto sea por la exposición continuada al antibiótico que acaba con la posible emergencia de mutaciones.

J.M. GATELL: Alvaro Pascual, cuando hablabas de cepas que se vuelven resistentes en contacto con el material extraño, ¿te referías a un problema físico de acceso del antibiótico por el *slime* o por el glicocálix, o a cambios intrínsecos en la composición enzimática de la cepa?

A. PASCUAL: Clásicamente, todo lo que sabíamos de la actividad de los antibióticos en biocapas era que el antibiótico no era activo porque no llegaba, por la existencia de impermeabilidad de la biocapa, porque las bacterias se hallaban en estado latente y al no multiplicarse rápido algunos antibióticos, como los betalactámicos, por ejemplo, no podían actuar, etc. Pero ahora podemos añadir un nuevo concepto: la existencia de algo que se libera del látex silicizado, que convierte la bacteria en resistente; es decir, la CMI a carbapenémicos se incrementa. Esto se observa tanto en presencia del biomaterial como en presencia de un medio de cultivo que ha contenido fragmentos de biomaterial durante unas horas. Sabemos que es por expresión de una nueva y eliminación de una de las porinas, proteína de membrana externa exactamente, de *Pseudomonas aeruginosa*.

J.M. MIRÓ: De las conclusiones obtenidas mediante vuestro modelo experimental, ¿habéis realizado algún tipo de aproximación a la clínica a la hora de intentar esterilizar los catéteres de diálisis, o basándose, sobre todo, en utilizar concentraciones de antibióticos muy elevadas por encima de las CMB de *S. aureus*?

J.A. CAPDEVILA: Somos un poco atípicos porque hemos empezado por la clínica y hemos acabado por el laboratorio. Ya hace tiempo que esterilizamos los catéteres por *S. epidermidis* y por *S. aureus*. El problema de este último es más complejo por el hecho de la bacteriemia asociada, que muchas veces nos obliga a retirar el catéter de entrada. Pero, sobre todo, por *S. epidermidis* y por bacilos gramnegativos, los hemos esterilizado con dosis altas de ciprofloxacino o amikacina, o bien con vancomicina frente

- a *S. epidermidis*. Estos resultados, ya publicados, han sido positivos en más del 90 % de los casos estudiados. Además, contrastan con resultados de series de pacientes que hemos revisado de la bibliografía que siendo tratados de una forma conservadora con antibióticos sistémicos y en algunos casos con perfusión continuada de antibióticos obtuvieron un fracaso del 30 %, entendiéndose como tal la retirada precoz del catéter o bien que, una vez retirado, se constata su infección.
- J.M. MIRÓ: En la práctica clínica ¿incluso siempre heparina?
- J.A. CAPDEVILA: Sí, porque no nos atrevemos a quitarla, aunque según la bibliografía no es necesario heparinizar un catéter que está cerrado, siempre y cuando tenga un calibre grande y esté en un vaso central, situación en la que el riesgo de trombosis es muy reducido. Además, es un problema de manejo, ya que es más complicado tener que preparar la mezcla de la heparina con la vancomicina que utilizar el antibiótico directamente.
- A. GIMÉNEZ: Como responsable de estabulario, querría formular una pregunta sobre los criterios en la elección de vuestros modelos experimentales y, concretamente, respecto al género del animal de experimentación. En un mismo modelo he apreciado que un grupo de investigadores emplea machos, mientras que otro utiliza hembras. Alguno de vosotros creo que ha comentado, incluso, la posibilidad de variaciones en los resultados con respecto al sexo. ¿Qué criterio rige la elección del género en vuestros modelos experimentales?
- J. GAVALDÀ: No tengo conocimiento de que se hayan demostrado diferencias con el empleo de uno u otro género en un mismo modelo experimental.
- J. PACHÓN: En el modelo de neumonía C57 BL6 se utilizan ratones hembras porque el modelo se estandarizó en este género, pero desconozco la existencia de diferencias con ratones machos. En cobayas el género es indistinto y en ratas, aunque nosotros no tenemos experiencia, tampoco he oído hablar de diferencias.
- P.J. CARDONA: En tuberculosis la elección del género es muy importante porque utilizamos modelos crónicos en los que los animales permanecen infectados durante meses. En esta situación, se ha observado que los machos poseen mayor agresividad, lo que desencadena una mortalidad superior. Por este motivo, se utilizan preferentemente hembras, a pesar de que los cambios hormonales de este género podrían ser un factor limitante considerable que puede afectar a la propia infección.
- M. CUENCA-ESTRELLA: En micología, donde no existe prácticamente ningún modelo estandarizado, se dispone de publicaciones en las que se han usado ambos géneros sin que se observen diferencias. Incluso se utiliza un modelo en ratones lactantes donde se mezclan ambos sexos en un mismo experimento.
- C. CABELLOS: En meningitis se utilizan animales hembras siguiendo el modelo descrito inicialmente. La única explicación al respecto es que se trata de un modelo que necesita mucha anestesia porque los animales tienen que estar dormidos durante períodos muy largos de tiempo y parece ser que la cantidad de anestesia que precisan las hembras es menor que la de los machos.
- J. CANTÓ: Desde mi punto de vista si realmente no hay diferencias y por razones éticas, puesto que hasta el momento no podemos seleccionar el género de los animales, quizá sería aconsejable utilizar ambos; si hubiera diferencias, sería también aconsejable utilizar los dos géneros para poder constatar y estudiar estas diferencias.
- J. BARBERÁN: Hemos utilizado ambos géneros muchas veces por disponibilidad de uno u otro en el estabulario. De todas formas, preferimos el macho por dos motivos: porque a veces nos hemos encontrado con algunas hembras preñadas, y porque según nuestra experiencia el macho es más dócil de manejar a la hora de inyectar el antibiótico.
- J.M. MIRÓ: En el modelo de endocarditis no creo que haya ninguna diferencia en utilizar machos o hembras, ni en la farmacocinética ni en el desarrollo de lo que es el modelo en sí. De todas maneras, la impresión es que cada uno de nosotros ha aprendido el modelo con uno u otro género, y así se ha ido perpetuando. Tal vez sería interesante investigar esta posible influencia de la anestesia en relación con el género.

---

# Modelo de infecciones intraabdominales

---

M. Carmen Balagué<sup>a,\*</sup>, Eduardo M<sup>a</sup> Targarona<sup>b</sup>  
y Miguel Cainzos<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Cirugía General. IDIBAPS-Hospital Clínic. Barcelona. <sup>b</sup>Servicio de Cirugía General y Digestiva. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. <sup>c</sup>Servicio de Cirugía General y Digestiva. Hospital General de Galicia. Santiago de Compostela. La Coruña.

---

## RESUMEN

La infección continúa siendo un grave problema en todas las disciplinas clínicas. El desarrollo de modelos experimentales de peritonitis ha resultado determinante en el progreso del conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos que tienen lugar en el peritoneo en presencia de una infección intraabdominal, así como en el estudio de posibles tratamientos.

En la actualidad, diferentes autores orientan sus estudios a la identificación y valoración del papel que ejercen los diferentes mediadores liberados por las células implicadas en la respuesta peritoneal y sus posibles interacciones, así como en el desarrollo de sustancias destinadas a la regulación de la respuesta del huésped.

Los modelos de peritonitis más utilizados consisten en la realización de ligadura y perforación cecal, inoculación intraperitoneal de cápsulas de gelatina con mezcla de heces o cultivos bacterianos o bien la implantación intraperitoneal de heces. Presentamos los aspectos técnicos para la realización de estos modelos cuya elección se basará en los objetivos del estudio que se desee realizar.

Por su parte, la introducción de la cirugía laparoscópica ha permitido reevaluar la fisiopatología de la infección intraabdominal, al observar una mejor respuesta peritoneal respecto a la cirugía abierta.

### *Palabras clave:*

Shock séptico. Absceso intraabdominal. Modelo experimental.

---

## INTRAABDOMINAL INFECTION MODEL

Infection is still a serious complication in all clinical disciplines. The development of experimental peritonitis models has allowed to progress in the knowledge of peritoneal pathophysiological events during peritonitis and to study different treatments.

Actually, different authors have oriented their studies not only to the identification and evaluation of peritoneal cells-induced mediators role and their interactions in the response to an intra-abdominal infection but also to the development of substances with ability to host response regulation.

The most used experimental peritonitis models have been the ligation with puncture of the cecum, intraperitoneal introduction of pooled feces mixed with barium sulphate or bacterial culture in a gelatin capsule and the installation of fresh feces through an abdominal incision. We present the technical aspects of different models. The aim of the study will determine its selection.

By another hand, the introduction of laparoscopic surgery has permitted to reevaluate the intra-abdominal infection pathophysiology after the observation of a better peritoneal response that after conventional surgery.

### *Key words:*

Sepsis syndrome. Intraabdominal sepsis. Experimental model.

---

## Introducción histórica

El descubrimiento de los antibióticos llevó a muchos a creer que la infección pasaría a formar parte de la historia de la medicina en lugar de continuar siendo un grave problema. Una década

después, la observación de resistencias a los antibióticos demostró la capacidad de adaptación de las bacterias. Otra vez la naturaleza enseñaba al hombre una importante lección de ecología que nunca debería olvidar. Más de 50 años después del descubrimiento de los antibióticos, la infec-

---

\*Correo electrónico: cbalagué@sendanet.es.

ción es todavía un grave problema en todas las disciplinas clínicas y continúa representando una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en pacientes con traumatismos graves<sup>1,2</sup>.

La experiencia clínica ha demostrado que a pesar de la aparición de nuevos y mejores antibióticos, éstos no son la única solución en el tratamiento del shock séptico, pero la diversidad de microorganismos implicados y los tratamientos, en muchas ocasiones individualizados, de los pacientes con sepsis, dificultan la realización de estudios controlados en el hombre. Esto hace necesaria la utilización de modelos experimentales que reproduzcan el curso clínico de la sepsis a partir de sus diferentes orígenes y permitan reducir el número de variables no controladas<sup>2</sup>.

Las interacciones existentes entre microorganismos y peritoneo han intrigado a multitud de investigadores y la capacidad de defensa de la cavidad peritoneal frente a una infección ha suscitado gran interés desde el siglo pasado, cuando se hizo evidente su capacidad de respuesta a una infección grave tanto en peritonitis clínicas como experimentales<sup>3</sup>.

Los primeros estudios, realizados a finales del siglo pasado, utilizaron la inoculación intraperitoneal de partículas de grafito y demostraron la existencia de un mecanismo de absorción peritoneal<sup>4,5</sup>. Inicialmente prevaleció la hipótesis de que las partículas eran absorbidas a través del citoplasma de las células mesoteliales diafragmáticas. Fue Florey<sup>6</sup> quien demostró que las partículas no pasaban a través de las células mesoteliales sino entre ellas.

Desde principios de nuestro siglo se ha considerado que la correlación anatómica con el mecanismo de eliminación de las partículas le corresponde al sistema linfático localizado por debajo del mesotelio diafragmático. Los movimientos inspiratorios y expiratorios del diafragma permiten la apertura y cierre de los *stomas* (bre-

chas) situados entre las células mesoteliales y el consecuente acceso desde la cavidad peritoneal a las lagunas linfáticas. Allen<sup>7</sup> demostró en sus estudios experimentales en ratones que las partículas de grafito podían encontrarse en el conducto torácico a los 3-5 min de su inoculación intraperitoneal, indicando la rapidez con la que algunas partículas pueden ser absorbidas. Así mismo, Allen y Weatherford<sup>8</sup> midieron el tamaño de los *stomas* en rata mediante la utilización de esferas de poliestireno. Higgins<sup>9</sup>, en estudios experimentales en perros, demostró que la exéresis del epiplón mayor no influía en el paso de grafito al conducto torácico, mientras que la neurectomía frénica, con la consecuente atrofia diafragmática, provocaba un incremento de la absorción translinfática.

Steinberg<sup>10</sup> utilizó inóculos bacterianos en sus estudios experimentales en perros y también comprobó el paso de bacterias al conducto torácico a los 6-10 min después de su inoculación intraperitoneal mientras que no se detectaban en sangre hasta pasados unos 30-40 min. Por otra parte, Cohn<sup>11</sup> estudió los efectos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus albus* sobre la capacidad de defensa de la cavidad peritoneal en el ratón y concluyó que la mortalidad se correlacionaba directamente con la proliferación bacteriana intraperitoneal, que los organismos que producían un retraso en la aparición de polimorfonucleares en la cavidad peritoneal eran algo más virulentos y que el crecimiento intraperitoneal ocurría cuando se excedía una relación 10:1 entre bacterias y fagocitos en cavidad peritoneal. Así pues, otro factor importante era la capacidad de respuesta celular local frente a la infección. En la actualidad, un aspecto ampliamente estudiado es el papel de los macrófagos intraperitoneales en el mecanismo de defensa del peritoneo frente a una infección<sup>3</sup>. Esto ha sido posible gracias al progresivo desarrollo de la biología molecular, que ha revelado una gran complejidad de respuestas celulares a un proceso séptico. Los modelos experimentales se han hecho decisivos en llevar este conocimiento al progreso clínico<sup>1</sup>.

TABLA I  
CONSIDERACIONES GENERALES AL  
PLANEAR UN ESTUDIO EXPERIMENTAL

1. Modelos alternativos: cultivos celulares
2. Características del animal a utilizar (modelo de animal "pequeño" o "grande")
3. Características de las diferentes especies para las reacciones de interés
4. Tratamiento del dolor y anestesia
5. Número de animales necesario para obtener resultados científicamente relevantes

### Descripción del modelo *in vivo*

#### *Consideraciones generales*

Antes de proceder a la descripción del modelo *in vivo*, es preciso tener en cuenta la posibilidad de alternativas como los cultivos celulares, el animal de experimentación que más puede ajustarse al estudio o el número de aquellos que serán necesarios (tabla I)<sup>1</sup>.

La utilización de cultivos celulares permite reducir el número de factores no controlados. Sin embargo, no ofrecen la posibilidad de reflejar las condiciones *in vivo*. Los cultivos celulares pueden utilizarse en la valoración del efecto (estimulación/inhibición) de una sustancia sobre una línea celular como paso previo a los estudios en animales de experimentación<sup>1</sup>, pero las interacciones entre órganos o la supervivencia no pueden estudiarse mediante modelos de cultivos celulares.

En cuanto a los modelos *in vivo*, es importante tener en cuenta que el estado nutricional, así como las reacciones a la anestesia y la manipulación del animal, son importantes moduladores de su sistema de defensa. En consecuencia, es conveniente monitorizar la respuesta humoral y celular del organismo una vez realizada la anestesia y antes del inicio del estudio<sup>12</sup>.

### *Selección del animal para el estudio*

Un paso previo a la selección del animal consiste en decidir si se utilizará un animal “grande” o “pequeño”. Los animales de pequeño tamaño son más económicos, manejables y ofrecen la posibilidad de poder utilizar un mayor número de los mismos en los grupos de estudio. Cuando el objetivo es valorar la mortalidad y la dosis o combinación de diferentes agentes, es preferible utilizar inicialmente animales pequeños y, posteriormente, pasar a un animal grande si es difícil la extrapolación de la dosis. Durante los últimos 40 años se ha obtenido una gran cantidad de información genética e inmunológica del ratón a partir de los numerosos estudios experimentales realizados en estos animales. Los modelos de infección intraabdominal realizados en ratones son de especial importancia cuando el objetivo principal del estudio es la medición de reacciones intercelulares y células inmunocompetentes<sup>1</sup>. Sin embargo, es frecuente que la monitorización de resultados obligue a la extracción de repetidas muestras de sangre con la consecuente dificultad de trabajar con animales pequeños como el ratón.

Los animales más utilizados en estudios de infección intraabdominal son la rata y el cerdo, que representan el mejor ejemplo de animales “pequeños” y “grandes”, respectivamente. Además, existe mucha información genética tanto sobre ratas como sobre cerdos, lo que favorece la producción comercial de sistemas de ensayos monoclonales y modificadores de la respuesta biológica específica de cada especie que permitirán su utilización en estudios en los que en el mo-

mento actual todavía se precisa la utilización del ratón, con las limitaciones que implica trabajar con un animal tan pequeño.

La rata es un buen animal de laboratorio para estudios de infección intraabdominal. Su anatomía y la respuesta a la peritonitis son muy similares a las reacciones observadas en humanos. Los órganos del sistema gastrointestinal, vascular y linfático tienen un tamaño suficiente para llevar a cabo procedimientos quirúrgicos y para la colocación de catéteres. En el momento actual es posible monitorizar adecuadamente una rata, lo que resulta de gran importancia en estos estudios.

### *Anestesia*

Otro aspecto a tener en cuenta es la posible interferencia de los procedimientos anestésicos sobre los resultados del estudio diseñado. La función cardiovascular y respiratoria variarán durante el shock séptico, pero es preciso tener en cuenta que estos cambios también dependerán de la profundidad de la anestesia. Este hecho será más evidente en estudios con cerdos en los que se utilicen barbitúricos, cuyas interferencias con la función cardíaca y respiratoria son conocidas. Es posible controlar este problema mediante la monitorización de las concentraciones de anestésico o mediante la utilización de anestésicos cuya interferencia sea mínima (p. ej., ketamina). Por ello, también resulta conveniente la monitorización tras la anestesia y antes de iniciar el estudio<sup>12</sup>. En caso de utilizar el cerdo como animal de estudio, es preciso tener en cuenta la posibilidad de una reacción de estrés importante o de una reacción hipertérmica letal debida a la utilización de halotano en la anestesia y que puede ser difícil de distinguir de una reacción aguda a la endotoxina o a microorganismos administrados para el estudio.

Nuestra pauta de anestesia en cirugía experimental en cerdo consiste en una premedicación con 10 mg/kg de azaperon por vía i.m., 60 min antes de iniciar la anestesia. La anestesia se induce con un bolo intravenoso de tiopental a dosis de 20 mg/kg. Otros autores administran un bolo de ketamina a dosis de 20 mg/kg por vía intramuscular<sup>13,14</sup>. En ese momento se intuba al animal y se mantienen las condiciones del ventilador con una  $FI_{O_2}$  de 0,5, un volumen tidal que permita mantener una  $pCO_2$  de  $40 \pm 5$  mmHg, y una frecuencia de 12-14 respiraciones/min. Estas condiciones de la ventilación son comunes para diferentes estudios experimentales<sup>13,14</sup>. La anestesia se pue-



de mantener con isoflurano inhalado a una concentración del 0,6-1 % y con una perfusión i.v. de 1 mg/h de bromuro de pancuronio que asegura la relajación muscular. Se mantiene una perfusión de suero fisiológico al 0,9 % y de suero glucosado al 5 % a dosis de 2 ml/kg/h cada una. Es importante mantener al animal a una temperatura central de 36,5-37,5 °C, si es necesario mediante la utilización de focos o bien con la administración de suero caliente.

Los estudios con animales pequeños permiten un manejo más fácil y no se precisa la infraestructura del animal grande. En el caso de la rata se puede utilizar como anestésico la inhalación continua de éter<sup>2,15</sup>, la administración intraperitoneal de pentobabital a una dosis de 15 mg<sup>16</sup>, o bien la administración intramuscular de ketamina a dosis de 50 mg/kg asociada con xilazina a dosis de 10 mg/kg<sup>17</sup>.

Utilizamos, para los estudios experimentales, ratones *swiss* albino machos CD-1 (Charles River, Saint Aubin Les Elbeuf, Francia) de 6-8 semanas de edad y con un peso de 25-30 g. La anestesia se realizó mediante la inoculación intraperitoneal de 0,05 ml de pentobarbital sódico al 5 %.

### *Monitorización del animal*

Para asegurar que estamos frente a un modelo de sepsis de origen abdominal se deben cumplir unos criterios básicos<sup>1</sup>:

1. Posibilidad de aislar microorganismos en la sangre o en la cavidad peritoneal.

2. Uno o más signos objetivos de infección: fiebre, taquicardia, taquipnea, oliguria, letargo o muerte.

3. Alteraciones de los parámetros celulares o bioquímicos.

La valoración de estos criterios, así como la realización de las determinaciones del estudio, requieren una adecuada monitorización del animal.

Para la obtención de muestras e infusión de sustancias es suficiente la colocación de un catéter venoso. Es posible la cateterización de la vena cava superior a través de punción en vena yugular<sup>18</sup>. Se han descrito un gran número de métodos de monitorización cardiovascular en ratas, pero debe tenerse en cuenta que la utilización de estos sistemas en un animal de reducido volumen sanguíneo como la rata puede interferir en el estudio y hacer que el modelo sea poco preciso, por lo que es recomendable una monitorización "global". Con la colocación de

un catéter en la vena cava y en la aorta ascendente pueden medirse el gasto cardíaco (por técnicas de dilución o microesferas) y la presión arterial. A partir de estos datos se podrán calcular las resistencias vasculares<sup>19-21</sup>. También puede estudiarse la linfa peritoneal mediante la cateterización del ductus torácico<sup>22</sup>, así como el consumo de oxígeno<sup>23</sup>.

La monitorización del animal grande presenta dos aspectos; por una parte, la monitorización básica y, por otra, la monitorización de un órgano concreto o una función celular. La monitorización básica puede realizarse mediante equipos clínicos estándar con pequeñas modificaciones o bien mediante equipos pediátricos, y consistirá en el soporte ventilatorio y en el control de la función respiratoria mediante gasetrías, así como la colocación de un catéter de Swan-Ganz a través de la vena yugular externa y de un catéter de presión arterial a través de la arteria femoral izquierda para el control hemodinámico. Es necesario mantener una perfusión continua de sueros (suero salino al 0,9 % y suero glucosado al 5 %) a una velocidad de 20 ml/kg/h durante la intervención quirúrgica y de 10 ml/kg/h durante el período de observación. Para el control de la diuresis es necesario realizar un sondaje vesical. Puede ser precisa la realización de una cistotomía en el caso del cerdo macho por la gran dificultad de colocación de una sonda vesical. La monitorización especial dependerá de los objetivos del estudio y, desde un punto de vista técnico, prácticamente todos los signos vitales medibles en humanos pueden controlarse en el cerdo.

### *Modelos in vivo de peritonitis*

Un modelo animal de infección intraabdominal ideal debería cumplir los siguientes requisitos:

1. Ser capaz de simular el proceso infeccioso observado en el humano.

2. Ser fácil de reproducir.

3. Producir una agresión séptica con poca variabilidad entre los animales.

Se han descrito diferentes tipos de modelos de peritonitis. La elección de uno u otro se basará en los objetivos del estudio diseñado:

1. Ligadura y perforación cecal.

2. Inoculación intraperitoneal de monocultivo bacteriano.

3. Colocación intraabdominal de cápsulas de gelatina con heces o cultivos bacterianos.

- 4. Implantación intraperitoneal de heces.
- 5. Isquemia de un segmento intestinal.
- 6. Modelo de absceso intraabdominal.

Por la legislación vigente, un cuadro de peritonitis bacteriana prolongada en animales grandes deberá incluir anestesia y soporte respiratorio mecánico (unidad de cuidados intensivos). Por ello, la mayoría de modelos están diseñados para obtener resultados de los objetivos planteados durante las primeras 12 h.

1. Modelo de ligadura y perforación cecal

Ryan et al<sup>24</sup> propusieron inicialmente un modelo de peritonitis producido mediante la ligadura y necrosis del ciego distal a la válvula ileocecal en la rata. Posteriormente, Chaudry et al<sup>25</sup> combinaron la ligadura con la punción del ciego, puesto que tras la ligadura aislada del ciego únicamente observaron la formación de abscesos sin mortalidad. Con la punción en el borde anti-mesentérico del ciego objetivaron un aumento significativo de la mortalidad, que dependía del tamaño o del número de punciones. Así pues, observaron que la realización de dos punciones daba lugar a una mortalidad del 94 % a las 48 h, mientras que con la realización de una única punción se obtenía una mortalidad del 90 % a los 5 días. Éste es un modelo utilizado con bastante frecuencia y muy reproducible. Con este modelo se puede obtener tanto la fase hiper como hipodinámica de la sepsis.

Es frecuente su utilización en animal de experimentación pequeño, sin embargo, es un modelo poco utilizado en el cerdo. Aunque no se conozca el tamaño del inóculo, el hecho de dejar una cantidad controlable de heces por debajo de la ligadura y la realización de un orificio de igual tamaño puede dar lugar a una salida bastante controlada de heces a la cavidad peritoneal. Deben tenerse en cuenta algunos detalles como asegurar una cantidad de heces por debajo de la ligadura y la ausencia de hemorragia en el lugar de la punción.

2. Modelo de inoculación intraperitoneal de monocultivo bacteriano

Es un modelo muy utilizado para inducir peritonitis en la rata<sup>3,15</sup>, pero es más difícil producir una mortalidad significativa y no reproduce el ambiente polimicrobiano de la peritonitis<sup>26</sup> con los consecuentes cambios secundarios a interacciones simbióticas. En consecuencia, es preferible un cultivo poliimicrobiano. Rotstein y Kao<sup>27</sup> demostraron en su modelo la importante sinergia existente entre *Escherichia coli* y *Bacteroides fragilis*.

Sin embargo, este modelo puede ser de utilidad en estudios en los que se pretende monitorizar la respuesta a una contaminación intraabdominal sin llegar a producir una peritonitis. Éste es el caso del estudio llevado a cabo por nuestro grupo. Para la valoración de la concentración de monocultivo bacteriano necesario para inducir la situación que queríamos estudiar fue necesaria la realización de un preestudio. Con este fin se definió el parámetro “concentración máxima subletal 72 h” (CMS72) como la concentración máxima de *E. coli* a la cual sobrevivían todos los ratones al cabo de 72 h. Para calcular este parámetro se administraron inóculos intraperitoneales de 1 ml de suspensiones en suero fisiológico (NaCl al 0,9 %) de *E. coli* a concentraciones crecientes y se comprobó que la CMS72 era 1 ml x 0,5 x 10<sup>4</sup> unidades formadoras de colonias (UFC)/ml (tabla II).

Se utilizan suspensiones de *E. coli* a diferentes concentraciones en función del estudio y del animal utilizado. Existe una importante variabilidad en cuanto a las concentraciones de inóculos utilizados, por ello se recomienda valorar previamente la concentración idónea para el mismo, utilizando márgenes pautados por estudios previos llevados a cabo por otros autores, lo que resulta más factible en animales pequeños. En el cerdo, suele utilizarse una inoculación intraperitoneal de aproximadamente 2,5 x 10<sup>9</sup> UFC de *E. coli*.

TABLA II  
VALORACIÓN DE LA DOSIS ADECUADA PARA EL ESTUDIO

Dosis infectiva	Número	Cultivo de líquido peritoneal	Hemocultivo	Mortalidad
10 <sup>2</sup> UFC/ML	10	- / +: 10/0	- / +: 10/0	0
10 <sup>3</sup> UFC/ML	10	- / +: 10/0	- / +: 10/0	0
10 <sup>4</sup> UFC/ML	10	- / +: 0/10	- / +: 4/6	0
10 <sup>6</sup> UFC/ML	10	- / +: 0/10	- / +: 0/10	4
10 <sup>8</sup> UFC/ML	10	- / +: 0/10	- / +: 0/10	10

3. Modelo de colocación de cápsula de gelatina con contenido fecal o bacteriano

A partir de 1974, se ha utilizado la colocación intraabdominal de cápsulas de gelatina que contienen heces o una mezcla de bacterias y sustancia adyuvante. Este modelo tiene la capacidad de semejar la formación de abscesos intraabdominales y dar lugar a una sepsis generalizada.

*Mezcla de heces en cápsulas de gelatina.* Existen diferentes posibilidades para la preparación del inóculo con que impregnar las cápsulas de gelatina, pero todas ellas se basan en una mezcla de heces y sulfato de bario al 10 % a partir del modelo descrito por Weinstein et al<sup>28,29</sup>. En este modelo, el estudio del exudado durante la fase de peritonitis aguda presentó un predominio de gérmenes aerobios *E. coli* y enterococo, mientras que los gérmenes anaerobios *B. fragilis* y fusobacterias predominaban durante la fase de absceso.

Lang et al<sup>2</sup> se basaron en el modelo de Weinstein y diseñaron un inóculo preparado a partir de la mezcla de heces frescas recogidas de 100 ratas mantenidas con una dieta estándar. Las heces se mezclaron con un volumen equivalente de concentrado de caldo de carne y el resultado se almacenó a -60 °C. En el momento del estudio, el inóculo se mezclaba con 2 volúmenes de suero salino y con sulfato de Bario al 10 %. El preparado resultante se colocaba en cápsulas de gelatina. En este estudio los tests bacteriológicos del inóculo tuvieron una distribución de colonias constante (tabla III). El inóculo fue preparado en condiciones aeróbicas, con una relación aerobios-anaerobios de 100:1.

Nichols et al<sup>30</sup> modificaron la técnica de Weinstein y utilizaron mezcla de heces humanas

con sulfato de bario a causa de las diferencias observadas entre la flora fecal humana y la de la rata. Los gérmenes predominantes en este estudio fueron *E. coli*, *Streptococcus fecalis*, *B. fragilis* y *Clostridium perfringens*.

Un detalle a tener en cuenta es que los tests bacteriológicos del inóculo presentarán diferencias en función de la dieta de los animales de los que se obtienen las heces para la preparación de la mezcla.

*Colonias de bacterias en cápsulas de gelatina.* Hansson et al<sup>31</sup> utilizaron este modelo según la descripción llevada a cabo por Onderdonk<sup>29</sup>. Para la preparación de las cápsulas se aislaron cepas de *B. fragilis* y de *E. coli* que crecieron en un medio de glucosa enriquecido (PYG) a 37 °C y en condiciones anaerobias durante 24 y 6 h, respectivamente, hasta obtener 10<sup>9</sup> UFC de cada una. Los cultivos fueron diluidos con PYG hasta obtener concentraciones de 2,5 × 10<sup>7</sup> de *B. fragilis*/ml y 1,3 × 10<sup>7</sup> de *E. coli*/ml. Se mezclaron volúmenes iguales de ambas preparaciones y se mezcló con un volumen igual de contenido colónico de rata esterilizado en el autoclave. Finalmente se añadió sulfato de bario al 10 %. La preparación se congeló a -80 °C hasta su colocación en cápsulas de gelatina en cantidades desde 0,35 a 1,10 g.

Las cápsulas de gelatina se colocan en la cavidad abdominal del animal mediante la realización de una laparotomía media.

4. Modelo de implantación intraperitoneal de heces

Rink et al<sup>32</sup> utilizaron este modelo que consiste en la implantación en la cavidad abdominal de heces frescas (1,25 g/kg) suspendidas en 2 ml de suero salino al 0,9 % a través de una incisión de la pared abdominal. Las heces se obtuvieron del ciego de una rata sometida a la misma dieta que las del estudio. No se utilizaron cápsulas de gelatina ni sustancias adyuvantes. La mortalidad fue del 100 % a las 24 h y los cultivos presentaban gérmenes aerobios y anaerobios.

5. Modelo de isquemia de un segmento intestinal

Algunos autores han basado sus modelos en la inducción de isquemia de un tramo intestinal.

Olofsson et al<sup>33</sup> utilizaron un modelo en el que sometían a las ratas a una isquemia del ciego y de los 20-30 cm distales del íleo mediante la ligadura selectiva de los vasos de la zona.

TABLA III  
BACTERIOLOGÍA DEL INÓCULO FECAL<sup>2</sup>

Microorganismo	UFC/ml
<b>Aerobios</b>	
<i>Lactobacillus</i>	10 <sup>8</sup>
<i>Enterococcus</i>	10 <sup>7</sup>
<i>Escherichia coli</i>	10 <sup>5</sup>
<i>Proteus</i>	10 <sup>5</sup>
<i>Klebsiella</i>	10 <sup>4</sup>
<i>Pseudomonas</i>	10 <sup>2</sup>
<b>Anaerobios</b>	
<i>Bacteroides</i>	10 <sup>6</sup>
<i>Clostridium</i>	10 <sup>2</sup>

UFC: unidades formadoras de colonias.

## 6. Modelo de absceso peritoneal

Resulta más difícil la elaboración de modelos experimentales que semejen la situación de un absceso intraabdominal localizado. En 1892 Massart fue capaz de reproducir esta situación mediante la colocación intraabdominal de un tubo de cristal abierto con cultivo bacteriano en su interior. Guirao et al<sup>34</sup> han desarrollado un modelo experimental de absceso intraabdominal en conejo. Para ello llevan a cabo la ligadura de los 4 cm distales del apéndice que se introduce a través de un orificio realizado en la base del epiplón con el que se cubre el apéndice asegurándolo con puntos de sutura. Tras reintroducir el apéndice cubierto por el epiplón en la cavidad abdominal, proceden a la instilación de 30 ml de suero salino en la cavidad abdominal y al cierre de la pared con puntos sueltos de seda 3/0. El tipo de microorganismos encontrados tras la rotura apendicular es similar a la flora en el hombre. Este modelo permite estudios metabólicos y nutricionales. Además, el tamaño del conejo permite la obtención de repetidas muestras de sangre de forma más factible que en el caso de utilizar un animal más pequeño.

### Ventajas y limitaciones del modelo experimental

Resulta difícil conseguir un modelo que cumpla los requisitos mencionados en el apartado anterior<sup>34</sup>. La mayoría de ellos, como la administración de suspensiones de bacterias, la ligadura y punción del ciego o la desvascularización de segmentos ileales, dan lugar a una infección aguda con una elevada mortalidad durante las primeras 72 h y posterior desaparición de la peritonitis en los animales que sobreviven. Estos modelos son útiles para el estudio de efectos sistémicos de la peritonitis y la influencia de los antibióticos. Los modelos diseñados para inducir una infección peritoneal moderada son más difíciles de conseguir<sup>35</sup>.

Por otra parte, la administración intraabdominal de heces presenta variaciones impredecibles en la tasa de mortalidad por la falta de estandarización de las especies bacterianas que pueden encontrarse. También la ligadura y punción del ciego, así como la desvascularización de segmentos ileales, dan lugar a una infección intraabdominal de gravedad impredecible con variabilidad de la peritonitis inducida debido a las diferencias individuales entre los animales en cuanto al contenido bacteriano cecal<sup>36,37</sup>. Esto hace que estos modelos sean fácilmente reproducibles desde el

punto de vista técnico pero no en cuanto a la obtención de resultados. Así mismo, la administración de una suspensión de cultivos polimicrobianos a una dosis conocida permite controlar estas situaciones pero, como se ha mencionado, el resultado es una mortalidad precoz dependiente de la dosis. Un inconveniente de la inoculación mediante punción con aguja en la cavidad peritoneal es que no se controla la localización de la punta de la aguja y el inóculo puede ser inyectado en la pared abdominal, en el intestino o en otros órganos intraperitoneales (tabla IV).

### Avances que ha supuesto el modelo en el conocimiento de la fisiopatología de las infecciones intraabdominales

La utilización de modelos experimentales de peritonitis ha sido muy útil en el estudio de la fisiopatología de las infecciones intraabdominales.

La caracterización de modelos de peritonitis ha permitido estudiar las fases iniciales en la evolución de una sepsis de origen abdominal<sup>2,28,29,38-40</sup>.

Para definir los procesos implicados en la respuesta del peritoneo a una infección, diferentes investigadores han examinado las características anatómicas y la capacidad de defensa del peritoneo (tabla V)<sup>3</sup>.

La superficie de la membrana peritoneal está compuesta por una línea de células mesoteliales situadas sobre una lámina basal pobremente definida y consistente en una estroma submesotelial con fibroblastos embebidos en una matriz colágena extracelular compuesta por colágeno tipo IV. A este nivel existen gran cantidad de capilares sanguíneos. El peritoneo que recubre la porción muscular del diafragma está interrumpido por un gran número de *gaps* (brechas, poros) intercelulares situados en el borde lateral de las células mesoteliales<sup>41</sup>. La ausencia en dicha localización de membrana basal permite la comunicación directa de estos *gaps* con los lagos linfáticos que circulan de forma paralela a la fibras musculares del diafragma y que drenarán a los conductos linfáticos a través de los ganglios linfáticos mediastínicos. El tamaño de estos poros aumenta en caso de peritonitis, facilitando el paso de bacterias o productos de las mismas (p. ej., endotoxina), así como de mediadores inflamatorios<sup>11</sup>. Diversos estudios experimentales han permitido estudiar esta vía de eliminación desde la cavidad peritoneal. Olofsson et al<sup>42</sup> observaron valores de endotoxina en el conducto torácico unas 400 veces más elevadas que en la sangre arterial y en la vena porta. En estos estudios la endotoxemia sis-

TABLA IV  
VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LOS DIFERENTES MODELOS DE PERITONITIS

<i>Modelo</i>	<i>Ventajas</i>	<i>Inconvenientes</i>
Ligadura y perforación cecal	Modelo sencillo Reproduce el ambiente polimicrobiano	Inóculo no conocido Mayor variabilidad de la peritonitis Mortalidad precoz
Inoculación intraperitoneal de monocultivo bacteriano	Menor variabilidad de la peritonitis Inóculo conocido Menor mortalidad precoz	No reproduce el ambiente polimicrobiano
Implantación intraperitoneal de heces	Reproduce el ambiente polimicrobiano	Mayor dificultad de preparación No estandarización del contenido bacteriano Variabilidad de la mortalidad
Cápsulas de gelatina con cultivos bacterianos	Menor mortalidad precoz Inóculo conocido Reproduce el ambiente polimicrobiano	Mayor dificultad de preparación
Isquemia de un segmento intestinal	Reproduce el ambiente polimicrobiano	No estandarización del contenido bacteriano

TABLA V  
MECANISMOS DE DEFENSA DEL PERITONEO

<i>Tipo</i>	<i>Descripción</i>
Innata	Actividad antibacteriana del líquido peritoneal, a través del complemento Absorción bacteriana a través de los estomas diafragmáticos Actividad fagocítica de los polimorfonucleares y los macrófagos Formación de abscesos Células <i>natural killer</i>
Específica	Producción de IgA Acumulaciones leucocitarias en el epiplón ( <i>milky spots</i> ) Linfocitos T memoria

Tomada de Heel<sup>11</sup>.

témica fue paralela a la aparición de endotoxina en el conducto torácico, lo que apoya la hipótesis de que la endotoxemia está preferentemente mediada por el transporte linfático a partir de la cavidad peritoneal (fig. 1).

Otro sistema de defensa del peritoneo es el epiplón, que tiende a localizar la infección mediante su adhesión a los lugares que presentan inflamación o perforación. Está muy bien irrigado

y contiene agregaciones celulares en su interior, conocidas con el nombre de *milky spots*, compuestas principalmente por macrófagos, además de polimorfonucleares y linfocitos. Durante la inflamación, su número y tamaño aumentan de forma significativa<sup>11</sup>. Este mecanismo justificaría el modelo de absceso intraperitoneal descrito por Guirao et al<sup>34</sup>.

Dunn et al<sup>3</sup> observaron que los macrófagos y la absorción translinfática representan la primera línea de defensa de la cavidad peritoneal. Observaron que el aclaramiento de bacterias de la cavidad peritoneal es extremadamente rápido, con eliminación de un mayor número de microorganismos que a través de la fagocitosis. Sin embargo, también comprobaron que el sistema fagocitario quedaba saturado con dosis de bacterias menores que a través de la absorción translinfática. Estos fagocitos iniciales se considera que son los macrófagos intraperitoneales, cuyo número se mantiene relativamente constante y que ejercen esta función hasta la llegada de polimorfonucleares. El aumento de polimorfonucleares en la cavidad abdominal viene favorecido por la liberación de mediadores quimiotácticos (leucotrienos y citocinas) a partir de los macrófagos y células mesoteliales del peritoneo<sup>43</sup> y por el aumento de la permeabilidad inducido por la liberación de prostaglandinas con acción vasodilatadora (PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub>). Todo parece apuntar a que la secreción de mediadores inflamatorios por los

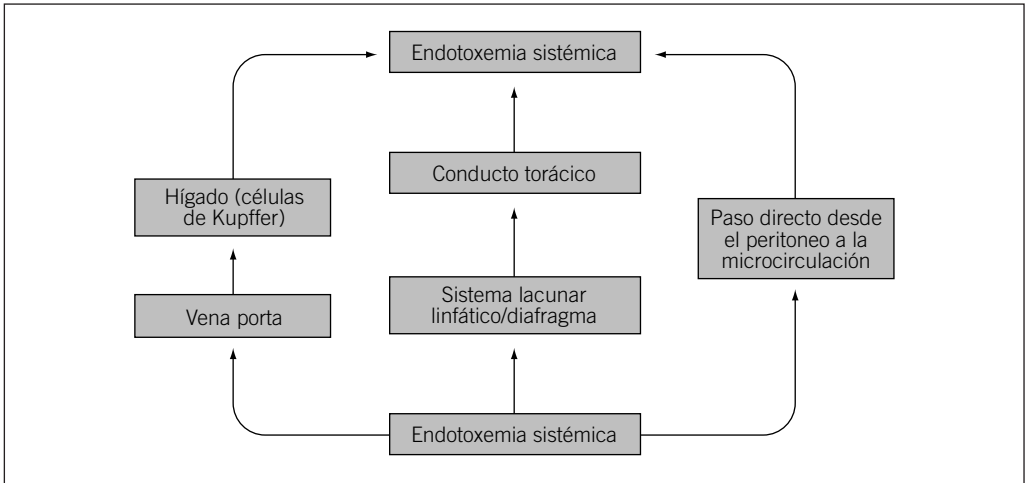


Fig. 1. Posibles rutas de transporte de la endotoxina desde el peritoneo a la circulación sistémica.

macrófagos conforma la respuesta inicial del huésped y que esta activación tiene lugar predominantemente en la membrana peritoneal, sin excluir el papel de los macrófagos del líquido peritoneal<sup>43,44</sup>.

En la actualidad, diferentes autores orientan sus estudios a la identificación y valoración del papel que ejercen los diferentes mediadores liberados como respuesta a una infección intraabdominal y en los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios con el objetivo de examinar la producción de citocinas en el ratón sometido a una peritonitis. Seki et al<sup>45</sup>, en un modelo experimental en ratón, han comprobado el papel crucial del interferón (IFN) gamma liberado por las células *natural killer* (NK) del hígado y de la interleucina 10 (IL-10), liberada por los macrófagos peritoneales en la cascada de acontecimientos que tienen lugar como respuesta a una peritonitis bacteriana.

Así mismo, también se valora el posible papel del óxido nítrico (NO), implicado en numerosos procesos fisiológicos y fisiopatológicos y cuya producción está regulada en la mayoría de casos por la actividad de la enzima NO-sintetasa (NOS). Mediante estudios inmunoquímicos se ha objetivado que los macrófagos son los mayores responsables de la expresión de la iNOS (isoforma de la enzima NO-sintetasa) en respuesta a la activación por endotoxina o citocinas<sup>46</sup>, y su acción estaría también relacionada con los mecanismos de defensa del huésped<sup>47-49</sup>. Diferentes estudios experimentales apoyan la actividad antimicrobiana del NO y han objetivado que la inducción de

iNOS por parte de la endotoxina y citocinas proinflamatorias (factor de necrosis tumoral [TNF], IL-1 e IL-6)<sup>50</sup> es muy eficaz. McMicking et al<sup>51</sup> observaron un deterioro de la respuesta a la infección con desarrollo de un shock endotóxico en ratones con deficiencia en la liberación de iNOS. Sin embargo, se han observado considerables diferencias en la regulación de la expresión de iNOS y su actividad en diferentes especies, existiendo cierto escepticismo en cuanto al papel de la iNOS en la defensa inmunitaria en el hombre.

Un aspecto importante a comentar y que ha llevado a la realización de un gran número de estudios es el fenómeno de la translocación bacteriana, entendida como el paso de bacterias localizadas en el tracto gastrointestinal a través de la mucosa intestinal hacia ganglios linfáticos mesentéricos y otros órganos. Si bien no es un modelo de peritonitis, sí que puede venir favorecida por ésta y puede mantener la situación de sepsis, además de producirse en otros cuadros clínicos o bien dar lugar a una peritonitis primaria en el cirrótico. Se han llevado a cabo diversos estudios experimentales con el objetivo de caracterizar este fenómeno, a menudo con resultados contradictorios<sup>52-56</sup>.

Se ha constatado este hecho cuando se produce un síndrome compartimental abdominal con compromiso del flujo esplácnico, como ocurre en pacientes quirúrgicos graves, en traumatismos graves o en quemados, así como también en cuadros de peritonitis. Deitch et al<sup>57</sup>, en un modelo experimental en ratón, objetivaron que la incidencia de translocación bacteriana estaba di-

rectamente relacionada con la presencia de endotoxina intraperitoneal y que este fenómeno era dependiente de la dosis. Por su parte, la reabsorción sistémica de esta endotoxina contribuye a la persistencia del cuadro según los estudios realizados por el grupo de Wilmore, en los que evidenciaron un incremento de la permeabilidad intestinal en presencia de endotoxina circulante<sup>58</sup>.

Si bien no está todavía bien establecida la relevancia de la translocación bacteriana en la patogenia de la peritonitis espontánea; diferentes autores han objetivado una mayor frecuencia de translocación bacteriana en animales cirróticos que desarrollan peritonitis bacteriana espontánea respecto a los animales con líquido ascítico estéril<sup>59,60</sup>. Sin embargo, todavía son necesarios más estudios que confirmen esta asociación.

Se ha estudiado el papel del estado inmunitario en la translocación bacteriana. Berg et al<sup>61</sup> han objetivado que la inoculación de fármacos inmunosupresores favorece la translocación bacteriana a los ganglios linfáticos mesentéricos, bazo, hígado y riñón en un modelo experimental en ratón. Simmons et al<sup>62</sup> han valorado la importancia de la inmunidad mediada por células y en estudios experimentales en ratones; la estimulación de las células T con IL-2 daba lugar a una significativa reducción de la incidencia de translocación bacteriana a los ganglios linfáticos mesentéricos.

### **Avances que ha supuesto el modelo en la profilaxis y el tratamiento de las infecciones intraabdominales**

Los estudios realizados por Weinstein et al en 1974<sup>28,29</sup> permitieron objetivar una evolución bifásica de la infección consistente en una fase inicial de peritonitis dependiente de los gérmenes aerobios y una segunda fase de absceso a expensas de gérmenes anaerobios. Los mismos autores<sup>63</sup> demostraron algo que otros autores han confirmado posteriormente: el hecho de que los antibióticos frente a gérmenes coliformes aerobios reducían la mortalidad en la fase de peritonitis, mientras que los antibióticos anaerobicidas disminuían la formación de abscesos de los supervivientes pero no la mortalidad. Aun existiendo esta distinción entre ambas fases, en estudios más recientes<sup>64</sup> se objetivó, sin embargo, que es necesaria la combinación de aerobios y anaerobios para que tenga lugar la formación de abscesos intraabdominales. Gracias a estos estudios sabemos que es preciso cubrir gérmenes aerobios y anaerobios si se desea que el tratamiento

antibiótico de una infección intraabdominal sea efectivo.

Los diferentes modelos de peritonitis anteriormente mencionados han sido utilizados para evaluar diferentes regímenes antibióticos<sup>16,65</sup>. Alm-dahl et al<sup>66</sup> demostraron la importancia del soporte con sueroterapia en un modelo experimental de peritonitis en ratas en las que la administración de nutrición parenteral o suero glucosalino disminuía significativamente la mortalidad del 100 al 50 %. Así mismo, cuando administraban por vía intravenosa una pauta de antibioterapia combinada con tinidazol y cefotaxima reducía la mortalidad al 15 %, que fue casi nula cuando se asoció una nutrición parenteral.

Trabajos recientes se han centrado en el desarrollo de sustancias destinadas a la regulación de la respuesta del huésped. Las citocinas pueden ser bloqueadas por pretratamiento con anticuerpos neutralizadores específicos. Estudios iniciales en los que se han utilizado anti-TNF sugirieron que protegían a ratones y conejos frente a los efectos letales de lipopolisacáridos (LPS) y bacilos gramnegativos. Por contra, el papel clínico de la terapia anti-TNF en presencia de un foco séptico continuado continúa sin aclararse.

En muchos de los estudios experimentales publicados sobre los efectos beneficiosos del tratamiento con la antiendotoxina, anti-TNF, e IL-1ra, esta terapéutica se instauró inmediatamente antes o, como máximo, dentro de las 2 h de la administración de una dosis de LPS y el tiempo de la terapia fue crítico. No parece existir beneficio si se suministra después de desarrollarse todo el síndrome del shock séptico. El síndrome clínico del shock séptico es raramente el resultado de la liberación de una sola dosis masiva de endotoxina bacteriana. Los pacientes con sepsis poseen un foco continuo de infección desde el cual se liberan de forma intermitente endotoxina y bacteria. La terapia con antiendotoxina parece actuar protegiendo contra el efecto de subsiguientes episodios de endotoxemia y bacteriemia antes que influir directamente en las condiciones del paciente en el momento de la administración del anticuerpo.

Una de las complicaciones más frecuentes tras la realización de cirugía sobre un abdomen con peritonitis consiste en la infección de la herida quirúrgica. La profilaxis antibiótica ha reducido de forma importante su incidencia y diferentes estudios clínicos y experimentales han permitido valorar los posibles factores decisivos en la eficacia de dicha profilaxis como son la farmacocinética, el momento de administración o los valores en tejidos del antibiótico utilizado. Algunos auto-

res han valorado el papel de la administración tópicamente de antibióticos con el fin de contrarrestar la posibilidad de concentraciones infraterapéuticas de los antibióticos sistémicos, pero los resultados no han sido concluyentes, probablemente en relación con diferencias en la cantidad de contaminación bacteriana de la herida o la presión utilizada para la irrigación. Badía et al<sup>67</sup> valoraron el papel de la irrigación de la herida con suero fisiológico como tratamiento adyuvante a la profilaxis antibiótica en cirugía contaminada y objetivaron que el factor más determinante para la infección de la herida fue el número de bacterias presentes en los márgenes de la herida al final de la cirugía y que la irrigación que utilizaban conseguía una importante reducción del número de bacterias presentes en la pared abdominal con una disminución significativa del número de infecciones de la herida.

En cuanto a la posible influencia de la translocación bacteriana en el desarrollo de peritonitis bacterianas espontáneas en cirróticos, Casafont et al<sup>60</sup> han observado una mayor prevalencia de translocación bacteriana en ratas cirróticas con malnutrición, lo que favorecía el desarrollo de una peritonitis bacteriana espontánea. Si estos hallazgos se confirman en pacientes cirróticos, la mejoría de su estado nutricional podría disminuir, según los autores, la translocación bacteriana y, como resultado, dar lugar a una significativa reducción del riesgo de complicaciones infecciosas, especialmente la peritonitis bacteriana espontánea.

### Nuevos planteamientos en la era laparoscópica

La aplicación de la laparoscopia en cirugía abdominal ha permitido comprobar que esta técnica ofrece una serie de ventajas clínicas que confluyen en la rápida recuperación del paciente. Puesto que la recuperación postoperatoria del paciente viene determinada por el grado de agresión inducido, la observación de una mejor recuperación postoperatoria en los pacientes sometidos a cirugía laparoscópica ha permitido establecer la hipótesis de que esta técnica conlleva un menor grado de agresión. Diferentes estudios han confirmado esta hipótesis a partir del estudio de la respuesta inflamatoria a través de la medición de las concentraciones de citocinas<sup>68-73</sup>.

Una de las ventajas clínicas observadas en los pacientes sometidos a cirugía laparoscópica es una menor incidencia de complicaciones infecciosas, como se desprende del análisis de series

amplias de pacientes intervenidos por laparoscopia. También se ha observado que la utilización de la cirugía laparoscópica en pacientes con una peritonitis establecida no incrementa la morbilidad postoperatoria<sup>74,75</sup> y un reciente metaanálisis ha confirmado que la apendicectomía laparoscópica se acompaña de un significativo descenso de las complicaciones infecciosas respecto a la cirugía abierta. Por su parte, Miserez<sup>76</sup> y Lau<sup>77</sup> objetivaron una morbilidad similar y un menor requerimiento de analgesia en los grupos de pacientes sometidos a cirugía laparoscópica frente a laparotomía como tratamiento del úlcus péptico perforado. Estos hechos permiten suponer que la cirugía laparoscópica no comporta efectos indeseables en un ambiente séptico.

Diversos estudios experimentales han estudiado la respuesta a la infección intraabdominal tras cirugía laparoscópica respecto a la cirugía abierta. Dos hechos relevantes que distinguen la cirugía laparoscópica de la convencional son la obtención de un espacio de trabajo mediante la realización de un neumoperitoneo y la utilización de CO<sub>2</sub> para obtenerlo. Varios estudios han valorado el efecto del CO<sub>2</sub> sobre una infección intraabdominal establecida. Jacobi et al<sup>78</sup>, en un modelo de peritonitis en rata, no objetivaron un incremento de la bacteriemia y de la formación intraperitoneal de abscesos tras laparoscopia en comparación con la laparotomía.

Nuestro grupo analizó la respuesta precoz a la contaminación peritoneal basándonos en la hipótesis de que la menor agresión quirúrgica y la mayor preservación de la integridad del peritoneo durante la cirugía laparoscópica respecto a la cirugía abierta conllevaría una mejor respuesta inicial a la infección peritoneal<sup>79</sup>. Esta hipótesis se confirmó al valorar los resultados obtenidos en los grupos a los que se indujo una contaminación abdominal, ya que los grupos de animales sometidos a una laparotomía presentaron un recuento de UFC/ml peritoneal significativamente superior, así como también un mayor porcentaje de hemocultivos positivos, tanto a las 24 h como a las 72 h respecto a los grupos laparoscópicos. Al estudiar la respuesta inflamatoria en estos grupos también observamos un aumento significativo de las concentraciones de citocinas en los grupos sometidos a cirugía abierta, tanto locales como sistémicas.

También se ha valorado el posible efecto lesivo de la presión intraabdominal elevada, y aunque Eleftheriadis et al<sup>80</sup> demostraron en un estudio experimental con ratas que la presión intraabdominal elevada (15 mmHg) daba lugar a una isquemia intestinal, con producción de radi-



cales libres de oxígeno e incremento de la translocación bacteriana, otros autores no han objetivado diferencias en la bacteriemia y la difusión hematogena de endotoxinas entre ambas técnicas aplicadas a modelos experimentales de peritonitis<sup>78,81,82</sup>. El nivel de presión intraabdominal utilizado puede justificar las diferencias obtenidas por Eleftheriadis. Se puede sugerir que una presión intraabdominal excesiva dé lugar a alteraciones de la circulación esplácnica y sistémica que justifiquen los hallazgos de Eleftheriadis, pero no es la situación habitual en la práctica clínica.

Por otra parte, tras la realización de una intervención quirúrgica existe un grado de inmunodepresión proporcional a la agresión provocada y que puede valorarse a través del estudio de algunos de sus componentes. Diversos autores<sup>83,84</sup> han estudiado la actividad de los macrófagos y de los linfocitos T, y han observado que tras la cirugía laparoscópica existe una mayor preservación de la capacidad fagocítica y de presentación del antígeno por parte del macrófago respecto a la cirugía abierta. En el caso de una contaminación intraabdominal, el déficit de capacidad fagocitaria producido favorecerá la proliferación bacteriana.

Bessler et al<sup>85</sup> estudiaron la función inmunitaria dependiente de los linfocitos T a través de la medición de la hipersensibilidad retardada, observando una función inmunitaria mejor preservada tras la cirugía laparoscópica.

Por otra parte, algunos autores consideran un posible efecto bacteriostático del CO<sub>2</sub> a partir de estudios en los que se objetivó un entretimiento del crecimiento de las bacterias sometidas a una atmósfera de CO<sub>2</sub>.

Otros autores consideran que la ausencia del aire ambiente durante la laparoscopia ejercería un papel protector contra la infección intraabdominal.

Evrard et al<sup>86</sup> valoraron la posible influencia del CO<sub>2</sub> en la inmunidad celular tanto sistémica como peritoneal. Partiendo de la base de que la disminución del pH tiene efectos adversos sobre la viabilidad de los linfocitos T y que el pH está en gran parte regulado por la presión parcial de CO<sub>2</sub>, estudiaron los efectos del neumoperitoneo con CO<sub>2</sub> sobre los linfocitos peritoneales sin objetivar diferencias en la viabilidad de los mismos antes y después del neumoperitoneo. Todo ello podría justificarse por un incremento en la producción local de bicarbonato.

Miner y Levine<sup>87</sup> no encontraron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano de las condiciones atmosféricas existentes durante la la-

paroscopia. En cambio, Collet<sup>88</sup>, en un estudio experimental realizado en el cerdo, demostró que el aclaramiento intraabdominal de *E. coli* tras su instilación era superior tras la insuflación de CO<sub>2</sub> respecto a la laparotomía. Así mismo, Champault et al<sup>89</sup> observaron un entretimiento del crecimiento bacteriano cuando sometieron colonias de *E. coli* y *S. aureus* a una atmósfera de CO<sub>2</sub>.

En conclusión, la cirugía laparoscópica permite mantener una mejor respuesta a la infección intraabdominal como consecuencia de un conjunto de factores entre los que destaca la preservación de la integridad funcional peritoneal, así como de la función inmunitaria y de la respuesta inflamatoria<sup>90</sup>.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Giercksky KE, Lundblad R. Animal models of intra-abdominal sepsis. En: Jeppsson B, editor. Animal modelling in surgical research. Malmö University Hospital, Lund University, Sweden. Harwood Academic Publishers, 11: 143-154.
2. Lang CH, Bagby GJ, Bornside GH, Vial LJ, Spitzer JJ. Sustained hypermetabolic sepsis in rats: characterization of the model. *J Surg Res* 1983; 35: 201-210.
3. Dunn DL, Barke RA, Ewald DC, Simmons RL. Macrophages and translymphatic absorption represent the first line of host defense of the peritoneal cavity. *Arch Surg* 1987; 122: 105-110.
4. Muscatello G. Ueber den Bau und das Aufsaugungsvermoegen des Peritoneum. *Arch Pathol Anat* 1895; 142: 327-359.
5. Durham HE. The mechanism of reaction to peritoneal infection. *J Pathol Bacteriol* 1897; 4: 338-382.
6. Florey H. Reactions of, and absorption by, lymphatics, with special reference to those of the diaphragm. *Br J Exp Pathol* 1927; 28: 479-490.
7. Allen L, Vogt E. A mechanism of lymphatic absorption from serous cavities. *Am J Physiol* 1937; 119: 776-782.
8. Allen L, Weatherford T. Role of fenestrated basement membrane in lymphatic absorption from peritoneal cavity. *Am J Physiol* 1959; 197: 551-554.
9. Higgins GM. Phrenic nephrectomy and peritoneal absorption. *Am J Pathol* 1930; 45: 137-157.
10. Steinberg B. Infections of the peritoneum. Nueva York: Paul B. Hoeber Inc., 1944; 30.
11. Heel KA, Hall JC. Peritoneal defences and peritoneum-associated lymphoid tissue. *Br J Surg* 1996; 83: 1.031-1.036.
12. Andersen OK. The influence of *Escherichia coli* endotoxin and trauma on some aspects of host defence [tesis doctoral]. Noruega: Dpt. of Surgery, University of Tromso, 1986.
13. Diebel LN, Dulchavsky SA, Wilson RF. Effect of increased intra-abdominal pressure on mesenteric arterial and intestinal mucosal blood flow. *J Trauma* 1992; 33: 45-49.

14. Germann R, Haisjackl M, Schwarz B, Deusch E, Meusburger S, Gruber E et al. Inotropic treatment and intestinal mucosal tissue oxygenation in a model of porcine endotoxemia. *Crit Care Med* 1997; 25: 1.191-1.197.
15. Andersson R, Tranberg KG, Alwmark A, Bengmark S. Factors influencing the outcome of *Escherichia coli* peritonitis in rats. *Acta Chir Scand* 1989; 155: 155-157.
16. Lahnborg G, Heström KG, Nord CE. Efficacy of different antibiotics in the treatment of experimentally induced intra-abdominal sepsis. *J Antimicrobial Chemotherapy* 1982; 10: 497-504.
17. Eleftheriadis E, Kotzampassi K, Papanotas K, Heliadis N, Sarris K. Gut ischemia, oxidative stress, and bacterial translocation in elevated abdominal pressure in rats. *World J Surg* 1996; 20: 11-16.
18. Nordstrand K. Mortality in rats on long-term parenteral nutrition. *Eur Surg Res* 1989; 19: 40-52.
19. Pedersen P, Biber B, Martinell S, Seeman T, Hasselgren PO. Hemodynamic and hematologic changes in a standardized trauma-sepsis model in rats. *Circ Shock* 1984; 14: 13-23.
20. Albrecht I. Arterial pressure, cardiac output and systemic resistance before and after pithing in normotensive and spontaneously hypotensive rats. *Acta Physiol Scand* 1975; 94: 378-385.
21. Idvall J, Aronsen KF, Nilsson L, Nosslin B. Evaluation of the microsphere method for determination of cardiac output and flow distribution in the rat. *Eur Surg Res* 1979; 11: 423-433.
22. Saldéan T, Linder E. A method for long-term collection of lymph from the thoracic duct in rats. *Acta Pathol* 1960; 49: 433-437.
23. Robinson KM, Miller HI. Free fatty acid turnover and oxidation after burn shock in guinea-pigs. *Circ Shock* 1981; 8: 283-290.
24. Ryan NT, Balckburn GL, Glowe GH. Differential tissue sensitivity to elevated endogenous insulin levels during experimental peritonitis in rats. *Metabolism* 1974; 23: 1.081-1.089.
25. Chaudry IH, Wichterman KA, Baue AE. Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels. *Surgery* 1979; 85: 205-211.
26. Kreger BE, Craven DE, Carling PC, McGabe WR. Gram-negative bacteremia. III. Reassessment of etiology, epidemiology and ecology in 612 patients. *Am J Med* 1980; 68: 332.
27. Rotstein OD, Kao J. The spectrum of *Escherichia coli*-*Bacteroides fragilis* pathogenic synergy in an intra-abdominal infection model. *Can J Microbiol* 1988; 34: 352-357.
28. Weinstein WM, Onderdonk AB, Bartlett JG, Gorbach SL. Experimental intra-abdominal abscesses in rats: development of an experimental model. *Infect Immun* 1974; 10: 1.250-1.255.
29. Onderdonk AB, Weinstein WM, Sullivan NM, Bartlett JG, Gorbach SL. Experimental intra-abdominal abscesses in rats: quantitative bacteriology of infected animals. *Infect Immun* 1974; 10: 1.256-1.259.
30. Nichols RL, Smith JW, Balthazar ER. Peritonitis and intraabdominal abscess: an experimental model for the evaluation of human disease. *J Surg Res* 1987; 25: 129-134.
31. Hansson L, Alwmark A, Christensen P, Jeppsson B, Holst E, Bengmark S. Standardized intraabdominal abscess formation with generalized sepsis: pathophysiology in the rat. *Eur Surg Res* 1985; 17: 155-159.
32. Rink RD, Short BL, Van N, Fry DE. Role of colonic bacteria in the pathophysiology of fecal peritonitis. *Circ Shock* 1977; 4: 259-270.
33. Olofsson P, Nylander G, Olsson P. Endotoxin-transport routes and kinetics in intestinal ischemia. *Acta Chir Scand* 1986; 151: 635-640.
34. Guirao X, García-Domingo M, Lladó L, Franch-Arcas G, Oliva A, Muñoz A, Sitges-Serra A. A new model of intraabdominal abscess: usefulness for hydrosaline metabolism studies in parenteral nutrition associated with sepsis. *J Surg Res* 1995; 59: 658-665.
35. Hesp WLEM, Hendriks T, Lubbers EJC, De Boer HHM. A reproducible model for protracted peritonitis in the rabbit. *Eur Surg Res* 1984; 16: 317-321.
36. Balish E, Cleven D, Brown J Yale CE. Note, throat, and fecal flora of beagle dogs housed in "locked" or "open" environments. *Appl Environ Micro* 1977; 34: 207.
37. Holdeman LV, Good IJ, Moore WEC. Human fecal flora: variation in bacterial composition within individuals and a possible effect of emotional stress. *Appl Environ Micro* 1976; 31: 359.
38. Clowes GH, O'Donnell TF, Ryan NT, Blackburn GL. Energy metabolism in sepsis: treatment based on different patterns in shock and high output stage. *Ann Surg* 1974; 179: 684.
39. Nichols RL, Smith JW, Balthazar ER. Peritonitis and intraabdominal abscess: an experimental model for the evaluation of human disease. *J Surg Res* 1978; 25: 129.
40. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock. A review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 1980; 29: 189.
41. Abu-Hijleh MF, Habbal OA, Moqattash ST. The role of the diaphragm in lymphatic absorption from the peritoneal cavity. *J Anat* 1995; 186: 453-467.
42. Olofsson P, Nylander G, Olsson P. Endotoxin: routes of transport in experimental peritonitis. *Am J Surg* 1986; 151: 443-446.
43. Topley N, Williams JD. Role of the peritoneal membrane in the control of inflammation in the peritoneal cavity. *Kidney Int* 1994; 46 (Supl): 71-78.
44. Topley N. The host's initial response to peritoneal infection: the pivotal role of the mesothelial cell. *Peritoneal Dialysis Int* 1995; 15: 116-117.
45. Seki S, Osada S, Ono S, Aosasa S, Habu Y, Nishikage T et al. Role of liver NK Cells and peritoneal macrophages in gamma-interferon and interleukin-10 production in experimental bacterial peritonitis in mice. *Infect Immun* 1998; 66: 5286-5294.
46. Lorente JA, Landín L, De Pablo R, Renes E, Liste D. L-arginine pathway in the sepsis syndrome. *Crit Care Med* 1993; 21: 1.287-1.295.
47. Morales-Ruiz M, Jiménez W, Ros J, Solé M, Leivas A, Bosch-Marcé M et al. Nitric oxide production by

- peritoneal macrophages of cirrhotic rats: a host response against bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1997; 112: 2.056-2.064.
48. McMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Ann Rev Immunol* 1997; 15: 323-350.
  49. Sessa WC. The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res* 1994; 31: 131-143.
  50. Stuehr DJ. Structure-function aspects in nitric oxide synthases. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37: 339-359.
  51. McMicking JD, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Fletcher DS, Trumbauer M et al. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* 1995; 81: 641-650.
  52. Berezi I, Bertok L, Baintner K, Veress B. Failure of oral *Escherichia coli* endotoxin to induce either specific tolerance or toxic symptoms in the rat. *J Pathol Bacteriol* 1968; 96: 481-486.
  53. Jacob A, Goldberg P, Bloom N, Degenshein A, Kozinn P. Endotoxin and bacteria in portal blood. *Gastroenterology* 1977; 72: 1.268-1.270.
  54. Nolan JP, Hare DK, McDevitt JJ, Ali MV. *In vitro* studies of intestinal endotoxin absorption. *Gastroenterology* 1977; 72: 434-439.
  55. Prytz H, Holst-Christensen J, Korner B, Liehr H. Portal venous and endotoxemia in patients without liver disease and systemic endotoxemia in patients with cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 1976; 11: 857-863.
  56. Triger DR, Boyer TD, Levin J. Portal and systemic bacteremia and endotoxemia in liver disease. *Gut* 1978; 19: 935-939.
  57. Deitch EA, Berg A, Specian R. Endotoxin promotes the translocation of bacteria from the gut. *Arch Surg* 1987; 122: 185-190.
  58. O'Dwyer ST, Michie HR, Ziegel TR, Revhaug A, Smith RJ, Wilmore DW. A single dose of endotoxin increases intestinal permeability in healthy humans. *Arch Surg* 1988; 123: 1.459-1.464.
  59. Runyon BA, Squier S, Borzio M. Translocation of gut bacteria in the rats with cirrhosis to mesenteric lymph nodes partially explains the pathogenesis of spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol* 1994; 21: 792-796.
  60. Casafont F, Sánchez E, Martín L, Agüero J, Pons F. Influence of malnutrition on the prevalence of bacterial translocation and spontaneous bacterial peritonitis in experimental cirrhosis in rats. *Hepatology* 1997; 25: 1.334-1.337.
  61. Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tracts of mice receiving immunosuppressive chemotherapeutic agents. *Curr Microbiol* 1983; 8: 285-292.
  62. Maddans MA, Wells CL, Platt JL, Condie RM, Simmons RL. Effect of T cell modulation on the translocation of bacteria from the gut and mesenteric lymph node. *Ann Surg* 1988; 207: 387-398.
  63. Weinstein WM, Onderdonk AB, BartlettJG, Louie TJ, Gorbach SL. Antimicrobial therapy of experimental intraabdominal sepsis. *J Infect Dis* 1975; 3: 282-286.
  64. Bartlett JG, Onderdonk AB, Louie TJ, Kasper DL, Gorbach SL. Lessons from an animal model of intra-abdominal sepsis. *Surgery* 1978; 113: 853-857.
  65. Bartlett JG, Louie TJ, Gorbach SL, Onderdonk AB. Therapeutic efficacy of 29 antimicrobial regimens in experimental intra-abdominal sepsis. *Rev Infect Dis* 1981; 3: 535-542.
  66. Almdahl SM, Nordstrand K, Melby K, Osterud B, Giercksky KE. Faecal peritonitis in the rat. An experimental model for evaluation of surgical and adjuvant therapies. *Acta Chir Scand* 1985; 151: 213-216.
  67. Badía JM, Torres JM, Tur C, Sitges-Serra A. Saline Wound irrigation reduces the postoperative infection rate in guinea pigs. *J Surg Res* 1996; 63: 457-459.
  68. Joris J, Cigarini I, Legrand M. Metabolic and respiratory changes after cholecystectomy performed via laparotomy or laparoscopy. *Br J Anaesth* 1992; 69: 341.
  69. Jakeways MS, Mitchell V, Hashim IA, Chadwick SJ, Shenkin A, Green CJ et al. Metabolic and inflammatory responses after open or laparoscopic cholecystectomy. *Br J Surg* 1994; 85: 127.
  70. Tada M, Murata N, Odaka A, Kobayashi M. The change of serum interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist after laparoscopic or conventional cholecystectomy [resumen]. *Surg Endosc* 1994; 8: 638.
  71. Targarona EM, Pons MJ, Balagué C, Espert JJ, Moral A, Martínez J et al. Acute phase: only significantly reduced component of the injury response after laparoscopic cholecystectomy. *World J Surg* 1996; 20: 528-533.
  72. Bellón JM, Manzano L, Bernardos L, García-Honduvilla N, Larrad A, Buján J, Álvarez-Mon M. Cytokine levels after open and laparoscopic cholecystectomy. *Eur Surg Res* 1997; 29: 27-34.
  73. Bolufer JM, Delgado F, Blanes F, Martínez-Abad M, Canos JL, Martín J et al. Injury in laparoscopic surgery. *Surg Lap Endosc* 1995; 5: 318-323.
  74. Balique JG, Guinot R, Mondesert C, Mortier L. Etude comparative rétrospective de 600 appendicectomies effectuées par laparotomie (McBurney) ou laparoscopie. *Chirurgie* 1994; 119: 504-510.
  75. Neugebauer E, Troidl H, Kum CK, Eypasch E, Miserez M, Paul A. The EAES Consensus Development Conferences on laparoscopic cholecystectomy, appendectomy, and hernia repair. *Surg Endosc* 1995; 9: 550-563.
  76. Miserez M, Eypasch E, Spangenberg W, Lefering R, Troidl H. Laparoscopic and conventional closure of perforated peptic ulcer. A comparison. *Surg Endosc* 1996; 10: 831-836.
  77. Lau WY, Leung KL, Kwong KH, Davey C, Robertson Ch, Dawson JJW et al. A randomized study comparing laparoscopic versus open repair of perforated peptic ulcer using suture or sutureless technique. *Ann Surg* 1996; 2: 131-138.
  78. Jacobi CA, Ordemann J, Böhm B, Zieren HU, Volk HD, Lorenz W et al. Does laparoscopy increase bac-

- teremia and endotoxemia in a peritonitis model? Surg Endosc 1997; 11: 235-238.
79. Balagué C, Targarona EM, Trias M. Cirugía laparoscópica e infección quirúrgica. Cir Esp. En prensa.
  80. Eleftheriadis E, Kotzampassi K, Papanotas K, Heliadis N, Sarris K. Gut ischemia, oxidative stress, and bacterial translocation in elevated abdominal pressure in rats. World J Surg 1996; 20: 11-16.
  81. Gurtner GC, Robertson CS, Chung SC, Ling TKW, Ip SM, Li AKC. Effect of carbon dioxide pneumoperitoneum on bacteraemia and endotoxaemia in an animal model of peritonitis. Br J Surg 1995; 82: 844-848.
  82. Dugne L, Fritsch S, Felten A, Gossot D, Colomer S, Celerier M et al. Effets de l'insufflation intra-péritonéale sur la dissémination hématogène des infections abdominales. Résultats préliminaires d'une étude expérimentale chez le rat. Ann Chir 1995; 49: 423-426.
  83. Griffith J, Sue-Ling N, Everitt A, Boylston A, Johnston D, McMahon MJ. Absence of postoperative immunosuppression after laparoscopic surgery. Gut 1992; 33 (Supl 1): 25.
  84. Anónimo. Postoperative immunosuppression. Laparoscopic versus open cholecystectomy [resumen 190]. Bordeaux: Proceedings of the III World Congress of Endoscopic Surgery, junio de 1992.
  85. Bessler M, Whelan RL, Halverson A, Treat MR, Nowygrad R. Is immune function better preserved after laparoscopic versus open colon resection? Surg Endosc 1994; 8: 881-883.
  86. Evrard S, Falkenrodt A, Park A, Tassetti V, Mutter D, Marescaux J. Influence of CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum on systemic and peritoneal cell-mediated immunity. World J Surg 1997; 21: 353-357.
  87. Miner DW, Levine RL. Microbiologic effects of atmospheric conditions used in operative laparoscopy. J Repr Med 1993; 38: 531-533.
  88. Collet D, Reynolds MA, Klar E, Siow Y, Trachtenberg L, Vitale G. Intra-abdominal clearance after either laparoscopic or open surgery. An experimental study (RES). Surg Endosc 1994; 8: 505.
  89. Champault G, Cruaud P, Guillon P, Taffinder N. Is carbon dioxide responsible for the reduction in postoperative infections following laparoscopic surgery?. Eur J Coelio Surg 1997; 3: 31-34.
  90. Balagué C, Targarona EM, Pujol M, Filella X, Espert JJ, Trias M. Peritoneal response to a septic challenge. Comparison between open laparotomy, pneumoperitoneum laparoscopy, and wall lift laparoscopy. Surg Endosc 1999; 13: 792-796.

## DISCUSIÓN

J.M. MIRÓ: A raíz de los resultados presentados, una conclusión sería que a menor agresividad, como es el caso de la laparoscopia, menor respuesta inflamatoria y por tanto esto favorece que haya menos infección intraabdominal en el modelo experimental, contrariamente a lo que ocurriría con la laparotomía, que produce mucha más agresividad quirúrgica y mucha mayor respuesta inflamatoria.

M.C. BALAGUÉ: Sí, tanto los modelos experimentales como clínicos han constatado que la respuesta inflamatoria es menor con la laparoscopia. Aunque también hay que tener en cuenta otros factores. Se ha observado que mediante este tipo de abordaje quirúrgico también está más preservada la inmunidad. Concretamente en casos de peritonitis se ha constatado una mejor capacidad fagocitaria de los macrófagos tras cirugía laparoscópica que tras cirugía abierta. Además, la menor lesión y desecación a nivel de la cavidad abdominal producida por esta técnica permiten una mejor preservación de los mecanismos locales de defensa y, en consecuencia, una mayor efectividad en la eliminación de bacterias a nivel peritoneal.

P.J. CARDONA: Sin embargo, las concentraciones de TNF y de IL-1 no varían significativamente.

M.C. BALAGUÉ: Sí que se observó cierto incremento superior de IL-1 con la laparotomía res-

pecto a la laparoscopia. Sin embargo, los resultados más evidentes se obtienen con IL-6 y con proteína C reactiva. Aunque otros autores han demostrado una mayor elevación del TNF en pacientes intervenidos por laparotomía, nuestros datos al respecto fueron muy variables y no pudimos llegar a unas conclusiones claras.

J.M. GATELL: Sí se atribuye una mayor tasa de infecciones a una respuesta inflamatoria más importante, ¿existe algún estudio con laparotomía que compare la respuesta al inóculo con la respuesta al inóculo junto con fármacos antiinflamatorios?

M.C. BALAGUÉ: En la revisión bibliográfica sobre el tema, no he encontrado ningún modelo con administración de antiinflamatorios. Sin embargo, se dispone de estudios que valoran la eficacia terapéutica de sustancias anti-TNF y de antagonista o anticuerpos frente al receptor de la IL-1, con las cuales se ha observado una disminución de la respuesta a la infección. Sin embargo, desde el punto de vista terapéutico estos estudios tenían poco valor, puesto que las sustancias debían administrarse inmediatamente antes de la infección o de forma simultánea, mientras que con su empleo posterior ya no eran efectivas.

J.M. MIRÓ: Muchos de nosotros somos clínicos o microbiólogos y, por tanto, un objetivo para no-

sotros sería disponer de un modelo para la prevención o el tratamiento de las infecciones intraabdominales. Basándoos en vuestra experiencia, ¿cuál de los seis modelos descritos crees que reúne las mejores condiciones para poder evaluar la eficacia del tratamiento de la infección intraabdominal?

M.C. BALAGUÉ: Creo que la utilización de las cápsulas de gelatina con suspensiones de *Escherichia coli* y *Bacteroides fragilis* es la que reúne las mejores condiciones. Considero que es el modelo que más se aproxima a la situación real, fácilmente controlable y con mayor uniformidad en cuanto a la obtención de resultados, a diferencia de otros modelos muy empleados como el de la ligadura y perforación cecal en los cuales no se controla el inóculo.

J. PACHÓN: En el modelo de la cirugía laparoscópica, la presión del gas que se introduce, ¿modifica la bacteriemia o la evolución de la infección?

M.C. BALAGUÉ: Nosotros no observamos cambios. Algunos autores, como Eleftheriadis han

descrito que presiones intraabdominales elevadas, de unos 15 mmHg en ratas, producían una mayor absorción translinfática y un mayor porcentaje de hemocultivos positivos. Sin embargo, otros grupos como el de Jacobi, también en rata y con presiones intraabdominales más bajas, por debajo de 10 mmHg, no observaron incrementos en la absorción intraperitoneal. Este último modelo se ajusta más a lo que nosotros utilizamos en clínica, en lo que a presiones intraabdominales se refiere. De todas formas, los estudios experimentales llevados a cabo hasta la fecha obtienen resultados contradictorios, en parte por la utilización de diferentes modelos de infección (con mayor o menor agresividad) o diferentes presiones intraabdominales. En la clínica diaria, todavía no hay resultados definitivos sobre el efecto del pneumoperitoneo en pacientes con peritonitis graves y/o shock séptico. En estos casos, probablemente deberemos recurrir a utilizar bajas presiones.

---

# Modelos animales de infecciones fúngicas

---

Manuel Cuenca-Estrella<sup>a</sup>, Juan Luis Rodríguez-Tudela<sup>a,\*</sup> y Joan Gavalda<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Unidad de Micología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. <sup>b</sup>Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital General Vall d'Hebron. Barcelona.

---

## RESUMEN

En las últimas décadas se ha producido un aumento en la prevalencia de las infecciones fúngicas que ha conllevado el desarrollo de todos los campos de la micología médica, incluidos los modelos experimentales de infecciones fúngicas. Hasta hace unos años, sólo existían modelos para realizar muestreos con antifúngicos, estudios de supervivencia o determinación de concentraciones plasmáticas de fármacos, pero en la última década se han desarrollado varios modelos discriminatorios que intentan reproducir la infección fúngica como ocurre en humanos, y que analizan diferentes parámetros que influyen en la secuencia de infección. En este artículo se describen algunos de estos modelos de infección fúngica. En primer lugar, un modelo de candidiasis diseminada en ratones, tras colonización sostenida del tracto gastrointestinal e inmunodepresión de los animales. A continuación, un modelo de aspergilosis invasora tras inoculación respiratoria e inmunodepresión. Por último, se describen brevemente otros modelos. Así mismo se incluyen también sus ventajas, limitaciones y posibles aplicaciones.

### Palabras clave:

Patogenia fúngica. Candidiasis sistémica experimental. Aspergilosis pulmonar.

---

## FUNGAL INFECTIONS ANIMAL MODEL

During last decades there has been a persistent rise in the prevalence of mycotic diseases afflicting humans that have led to a significant expansion of our knowledge of the medical mycology. Experimental models of fungal infections are an integral part of these progresses. A few years ago, animal models of infection evaluated the efficacy antifungal agents, survival rate or plasmatic levels of antifungal agents. During last years have been developed discriminative models that are designed to mimic the infection in humans. In these models, multiple parameters of efficacy are measured to ascertain the initiation and progress of fungal infections. Herein we described two discriminative models of fungal infection. Firstly, a mice model of sustained gastrointestinal colonization by *Candida albicans* and disseminated infection after immunosuppression. Likewise, a model of invasive aspergilosis in immunosuppressed mice is also summarized. Finally, other models of fungal infection are briefly described. Advantages, limitations and applications are also included.

### Key words:

Fungal pathogenesis. Experimental systemic candidiasis. Pulmonary aspergilosis.

---

## Introducción histórica

La micología médica posee una historia relativamente corta. Puede aceptarse que esta especialidad de la microbiología se inició a finales del siglo XIX. De esta fecha datan las primeras descripciones de los principales agentes etiológicos de micosis, tanto en humanos como en animales

(dermatofitosis, aspergilosis, candidiasis, criptococosis, histoplasmosis, etc.). No obstante, no ha sido hasta las últimas décadas cuando se ha observado que las infecciones fúngicas han aumentado en número y en gravedad, lo que ha conllevado un mayor desarrollo de la micología médica<sup>1</sup>. Este incremento de las micosis se ha producido en paralelo al del número de enfermos inmuno-

---

\*Correo electrónico: juanl.rodriguez-tudela@isciii.es.

deprimidos, pacientes que por sus características y por las prácticas diagnósticas y terapéuticas a las que se ven sometidos, han proporcionado la base para que se produzcan cambios ecológicos y epidemiológicos que están desplazando a los patógenos fúngicos tradicionales<sup>2,3</sup>.

Esta breve historia de la micología médica ayuda a entender las razones por las que apenas existieron avances científicos en este campo hasta los años sesenta, y por qué, desde entonces, los progresos han sido constantes. En estos años se descubrieron los primeros antifúngicos con utilidad terapéutica (5-fluorocitosina y algunas moléculas poliénicas), y tras ellos han ido surgiendo los que actualmente se utilizan en la práctica clínica diaria (azoles, anfotericina B, antifúngicos lipídicos, etc.). También se han conseguido pruebas diagnósticas eficaces y en los últimos años se dispone de técnicas de tipificación subespecífica<sup>4,5</sup>.

Obviamente, los modelos de infección fúngica en animales se han visto influidos por el desarrollo de la micología médica. Desde 1960 hasta 1985 se describieron más de 1.000 modelos animales que valoraban diferentes aspectos sobre el uso de antimicrobianos en los cuadros infecciosos. De todos ellos, una veintena estaban diseñados para el estudio de la infección fúngica y de los antifúngicos y, además, se desarrollaron intentando reproducir las infecciones fúngicas primarias y las infecciones de la piel y las mucosas<sup>6</sup>.

El aumento en la prevalencia de las infecciones fúngicas diseminadas en pacientes inmunodeprimidos, junto con la aparición de fármacos antifúngicos útiles para el tratamiento de estas infecciones, han conllevado que en la última década se hayan publicado varias decenas de modelos experimentales de infección fúngica<sup>7-9</sup>.

En la actualidad, existen modelos de variados diseños y utilidades. La complejidad de los mismos, junto con la brevedad de estas líneas, obligan a describir con detalle únicamente los que aportan más información y que, por tanto, pueden tener una mayor utilidad. Son los denominados *modelos discriminatorios*, que intentan reproducir la infección fúngica como ocurre en humanos, y que analizan multitud de parámetros para obtener la mayor información posible (factores de virulencia, farmacocinética, farmacodinamia, etc.)<sup>9</sup>. No obstante, en micología no se han desarrollado modelos que puedan considerarse de referencia. No existe acuerdo sobre qué especies animales deben emplearse. Tampoco lo existe sobre la edad, el género, el régimen inmunosupresor y el inóculo.

Aun así, en los últimos años se han publicado numerosos trabajos que han desarrollado algunos

modelos animales de infección fúngica. A éstos va a referirse el presente artículo. En primer lugar, se describirá un modelo de colonización gastrointestinal por *Candida albicans*, con diseminación sistémica. En segundo término, un modelo de infección invasora por *Aspergillus fumigatus*, tras colonización previa del tracto respiratorio, y como tercer y último punto, se resumirán brevemente otros modelos de infección fúngica de probada utilidad.

## Modelos de infecciones fúngicas

### *Modelo de candidiasis sistémica*

En los primeros modelos experimentales que se desarrollaron intentando reproducir las infecciones diseminadas por *C. albicans*, las levaduras se inoculaban por vía intravenosa<sup>7</sup>. Pero los modelos de infección deben imitar lo más posible las vías de contagio y diseminación que utilizan los agentes infecciosos en el ser humano. Así, desde que se conoce que la mayoría de las infecciones por *C. albicans* tienen un origen endógeno, se han desarrollado nuevos modelos de candidiasis profunda o diseminada. *C. albicans* y otras especies de *Candida* forman parte de la flora comensal del tracto gastrointestinal humano. Desde esta localización pueden diseminarse causando infecciones profundas en enfermos inmunodeprimidos o con otros factores desencadenantes<sup>4</sup>. De esta forma, los modelos de candidiasis diseminada que se emplean actualmente se basan en la colonización sostenida del tracto gastrointestinal de los animales de experimentación, en la inmunosupresión de los mismos y en la valoración de la infección diseminada.

#### 1. Descripción del modelo

*Animales de experimentación.* Se han desarrollado modelos de este tipo en varias especies de animales (ratón, rata, conejo, etc.), aunque en la mayoría de ellos se utilizan ratones Swiss libres de patógenos específicos. No existe acuerdo sobre el peso, el género o la edad de los mismos<sup>10-15</sup>.

*C. albicans* no es constituyente habitual de la flora intestinal del ratón, y además, el tracto gastrointestinal de los ratones adultos sanos no suele colonizarse con facilidad<sup>16,17</sup>. Por ello, estos modelos se diseñan con ratones neonatos o ratones adultos que son tratados con antibióticos de amplio espectro y fármacos inmunodepresores para facilitar la colonización por levaduras o incluso, se usan ratones inmunodeprimidos me-

dante manipulación genética (BALB/c, CD2F1, etc.). Los ratones neonatos se utilizan por su facilidad para ser colonizados, dada la inmadurez de su sistema inmunológico y la escasez de su flora intestinal<sup>7,10-15,18</sup>.

No obstante, si se quiere reproducir fielmente la secuencia de esta infección en humanos, la colonización sostenida debe conseguirse antes de que los ratones estén inmunodeprimidos. En este sentido, se han desarrollado varios modelos que intentan conseguir la colonización gastrointestinal sostenida sin emplear ratones inmunodeprimidos ni fármacos inmunosupresores. Entre éstos destacan los que añaden el inóculo al pienso de los ratones<sup>19</sup>, los que suplementan el agua con hidratos de carbono<sup>20</sup> y los que utilizan dosis bajas de antibióticos de amplio espectro<sup>21,22</sup>. Las estrategias son muy variadas, pero en todos se busca la colonización gastrointestinal sostenida por *C. albicans*, tras la cual, se los ratones son tratados con inmunosupresores.

En la Unidad de Micología del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III se ha estandarizado un modelo murino de colonización gastrointestinal sostenida por *C. albicans* en ratones adultos sanos (Swiss/CD-1). Para conseguir la colonización se emplea agua estéril suplementada con glucosa (50 g/l) y tetraciclina (1 g/l).

*Inoculación de los animales.* Dependiendo de la estrategia empleada para conseguir la colonización gastrointestinal, la inoculación debe planearse de una u otra manera. En los modelos descritos, los ratones son tratados con antibióticos o hidratos de carbono de 3 a 15 días antes de ser inoculados<sup>20</sup>. En el modelo con glucosa y tetraciclina, el agua de los ratones se suplementa 48 h antes del inóculo.

El inóculo empleado debe ser elevado, entre  $1 \times 10^6$  y  $5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC)/ml<sup>10-15</sup>. Se ha observado que con inóculos más bajos no se obtienen buenos resultados en la colonización gastrointestinal. Cada ratón es inoculado intragástricamente con 0,1-0,2 ml, mediante agujas especiales de punta roma para alimentación animal.

*Valoración de la colonización gastrointestinal por C. albicans.* La colonización gastrointestinal se valora mediante cultivos de heces de ratones elegidos al azar. Puede aceptarse que se ha conseguido la colonización sostenida cuando se obtienen coprocultivos uniformemente positivos para *C. albicans*, durante 10-14 días, y con valores de colonización de  $10^2$ - $10^6$  UFC/g de heces.

En algunos modelos se ha analizado la influencia de las levaduras y los suplementos sobre la flora gastrointestinal del ratón. En el caso de la tetraciclina, ésta origina descensos tanto en la flora aerobia y anaerobia facultativa como en la anaerobia estricta, aunque existen datos que indican que sus efectos se producen, principalmente, por la inhibición de la flora anaerobia facultativa<sup>21</sup>. En la figura 1 se representan las alteraciones en la flora intestinal por especies bacterianas, además de la colonización por *C. albicans*.

Con la utilización de hidratos de carbono se observa que *C. albicans* puede pasar a fase micelial con mayor facilidad, lo que conlleva un mayor grado de penetración en la mucosa gastrointestinal<sup>20</sup>. Ambas consecuencias, el descenso de la flora bacteriana y la penetración en la mucosa gastrointestinal, pueden explicar la colonización sostenida.

*Inmunosupresión.* Una vez que se ha documentado una colonización gastrointestinal sostenida, se debe pasar a la inmunosupresión de los ratones, con el fin de que las levaduras se diseminen desde el tracto gastrointestinal. Se han utilizado diferentes regímenes con un solo inmunosupresor o con combinaciones. Las combinaciones de fármacos citostáticos y de corticoides son las que obtienen inmunodepresiones más profundas (menos del 10% de los valores normales de leucocitos)<sup>23,24</sup>.

Las dosis de inmunodepresión pueden pautarse cada 24, 48 o 72 h. La vía de administración suele ser mediante inyecciones intraperitoneales o intravenosas. En el modelo estandarizado en la Unidad de Micología del Centro Nacional de Microbiología se emplean ciclofosfamida (150 mg/kg de peso) y metilprednisolona (65 mg/kg de peso) cada 72 h, por vía intraperitoneal. Con esta pauta se consigue una profunda inmunosupresión a la séptima u octava dosis.

Los descensos en el número de leucocitos pueden determinarse mediante recuentos celulares de la sangre periférica de ratones seleccionados, realizados en un hematocitómetro.

*Evaluación de la diseminación.* En el ratón, la candidiasis diseminada ocasiona inmovilidad, pérdida de peso y erección pilosa; también pueden aparecer síntomas oculares y cerebelosos. Cuando se observa alguno de estos signos entre los ratones inoculados, los animales se sacrifican mediante dislocación cervical. En el caso de que se esté valorando la respuesta a un tratamiento antifúngico, se observa la evolución de los animales, y se sacrifican aquellos en los que aparece fallo terapéutico.



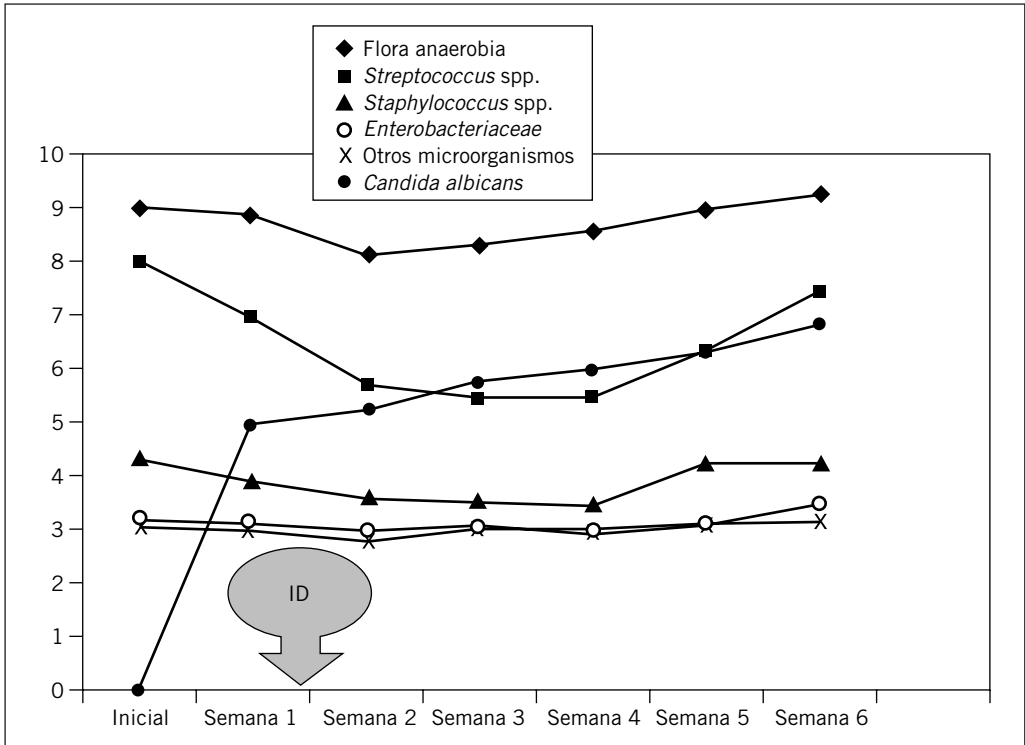


Fig. 1. Alteraciones en la flora intestinal de los ratones, a lo largo de las semanas de duración del modelo de candidosis diseminada de la Unidad de Micología del Centro Nacional de Microbiología. El gráfico también representa la colonización por *C. albicans*; ID: día en que se comienza el régimen inmunodepresor. Los resultados se expresan en UFC/g de heces + log<sub>10</sub>.

Es importante tener en cuenta que los fármacos inmunodepresores pueden producir síntomas como inmovilidad y pérdida de peso. Por ello, se debe incluir en el experimento un grupo control sin inocular, pero al que se le aplican estos fármacos.

Los ratones sacrificados con sospecha de candidiasis diseminada se diseccionan en condiciones asépticas. Se toman muestras de varios órganos, generalmente hígado, riñones y bazo, aunque pueden incluirse otros como pulmones, corazón y cerebro. Se hacen cultivos cuantitativos de las muestras viscerales, anotando los resultados en UFC por g de órganos.

Se pueden realizar siembras en medios para cultivo de bacterias, con la intención de analizar si las levaduras se diseminaron en compañía de flora intestinal, ya que la presencia de bacterias en las vísceras puede influir negativamente en las futuras aplicaciones del modelo de infección fúngica.

En la tabla I se observan los resultados obtenidos con el modelo empleado en la Unidad de Micología del Centro Nacional de Microbiología. Descritos brevemente, se obtuvo la colonización gastrointestinal sostenida en el 100 % de los ratones inoculados (se utilizaron seis aislamientos clínicos de *C. albicans*), y la diseminación se observó en el 60 % de los animales.

Un aspecto interesante a la hora de evaluar la diseminación es la realización de estudios histológicos. Los exámenes anatomopatológicos de los órganos infectados aportan una valiosa información. Se ha observado que la unión gastroesofágica (UGE) es el lugar en el que se produce un mayor nivel de colonización. En el cuerpo del estómago, en el duodeno y en el yeyuno-íleon la colonización es mucho menor<sup>7</sup>. En la UGE se observan levaduras en fase micelial, que pueden llegar a penetrar hasta la submucosa. La evolución de la lesión suele conllevar profundas úlceras necróticas, desde donde se produce la dise-

TABLA I  
RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL MODELO DE CANDIDOSIS DISEMINADA DE LA UNIDAD DE MICOLOGÍA DEL CENTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA

Grupos	Día de inicio inmunosupresión		Día de la muerte <sup>a</sup>		Diseminación	
	Ratones colonizados <sup>b</sup>	Concentración en heces <sup>c</sup>	Ratones colonizados <sup>b</sup>	Concentración en heces <sup>c</sup>	Ratones con diseminación <sup>b</sup>	Concentración en órganos <sup>c</sup>
Controles	0/10	0	0/10	0	0/10	0
Agua estéril <sup>d</sup>	8/30	2,91 ± 0,31	24/30	4,80 ± 0,28	3/30	2,73 ± 0,67
Tetraciclina y glucosa <sup>e</sup>	30/30	5,28 ± 0,18	30/30	7,08 ± 0,31	18/30	4,14 ± 1,31

<sup>a</sup>Día de la muerte hace referencia al día en que los ratones fueron sacrificados por presentar síntomas de candidiasis diseminada, o si no la presentaron, al día final del experimento.

<sup>b</sup>Los datos indican ratones número de ratones infectados/número total de ratones por grupo.

<sup>c</sup>Los datos se expresan en media ± desviación típica de las UFC/g de heces × log<sub>10</sub>.

<sup>d</sup>Agua estéril se refiere a los ratones que estaban inoculados pero que no fueron tratados con glucosa y tetraciclina; <sup>e</sup>ratones que fueron tratados con glucosa y tetraciclina.

minación, generalmente por vía hematógena, aunque en algunos casos puede seguir el sistema linfático o simplemente provocar fístulas e infectar las vísceras por continuidad<sup>25</sup>. En los modelos que emplean suplementos dietéticos de hidratos de carbono se ha observado un mayor número de levaduras en fase micelial, penetrando y ulcerando la mucosa gástrica<sup>20</sup>. Esto puede explicar los porcentajes de diseminación tan elevados que se obtienen en estos modelos. El uso de antibióticos de amplio espectro ayuda a la colonización gastrointestinal, pero parece ser sólo un coadyuvante de la diseminación, ya que no debe olvidarse que, siendo la UGE el lugar en el que se produce una mayor colonización, ulceración y diseminación, la flora bacteriana es muy escasa en esta zona del tracto intestinal.

También aportan información los estudios histológicos de los órganos infectados. En ellos suelen observarse microabscesos con necrosis central, y abundantes levaduras e hifas infiltrando los tejidos y produciendo necrosis celular<sup>7</sup>. La respuesta inmunitaria no se conoce con exactitud, pero parece estar mediada por la colaboración de varios factores. Linfocitos T, macrófagos, neutrófilos y monocitos participan en ella, y varias citocinas, factores de necrosis tumoral y el factor estimulante de colonias de granulocitos-macró-fagos parecen modularla<sup>2-4</sup>. En animales inmunodeprimidos la respuesta, obviamente, varía. Los citostáticos, como la ciclofosfamida, lesionan células en división, como las de la médula ósea y las de la mucosa gastrointestinal. La lesión sobre esta última contribuye a la diseminación hematógena de las candidiasis de origen endógeno. Los corticoides afectan a la respuesta inmunita-

ria celular. Así, en los tejidos de ratones inmunodeprimidos la respuesta inmunitaria es escasa, por lo que se producen los microabscesos y la infiltración necrosante.

## 2. Ventajas y limitaciones del modelo

Con anterioridad se destacó que los modelos animales deben intentar imitar la secuencia de infección como ocurre en el ser humano. Los modelos que inoculan intragástricamente las levaduras, y después causan la inmunodepresión de los animales reproducen con bastante fidelidad la candidiasis sistémica de origen endógeno de los pacientes inmunodeprimidos. Por ello, los experimentos que se planean en estos modelos aportan una información que puede ser aplicada para el estudio de esta infección en humanos. En la tabla II y en el apartado de "Aplicaciones del modelo" se resumen las principales aplicaciones de estos modelos, y los avances que han supuesto para el estudio de esta infección fúngica.

Los modelos que inoculan las levaduras por vía intravenosa no reproducen la vía de infección de las candidiasis sistémica de origen endógeno. No obstante, se emplean en estudios de supervivencia que analizan la virulencia o la respuesta al tratamiento o a la profilaxis con un antifúngico. Los resultados obtenidos en estos trabajos deben interpretarse con rigor, y no deben aceptarse con facilidad extrapolaciones al ser humano, ya que la fisiopatología de esta infección no ha sido reproducida en el modelo.

Por otra parte, los modelos que utilizan la colonización gastrointestinal presentan algunas limitaciones que deben valorarse a la hora de pla-

TABLA II  
POSIBLES APLICACIONES DEL MODELO DE CANDIDIASIS DISEMINADA

<i>Aplicaciones</i>	<i>Características de las que existen datos publicados</i>
Estudio de factores de virulencia	Adhesinas Aspartil proteasas Propiedades hidrofóbicas Fase micelial
Estudio de factores favorecedores	Alteraciones de la flora bacteriana Lesiones en la mucosa gastrointestinal
Análisis de la respuesta inmunitaria	Respuesta inmunitaria celular Inmunomoduladores Posibilidad de estudiar ratones con alteraciones genéticas
Valoración de moléculas antifúngicas	Estudios farmacocinéticos Modelos profilácticos Modelos terapéuticos Correlación <i>in vitro-in vivo</i> Modelos con nuevas moléculas Estudios de sinergismo

near su desarrollo. En primer lugar, la necesidad de inducir en los ratones una inmunodepresión tan intensa obliga a trabajar con material estéril. La estabulación y el mantenimiento de los animales deben incluir pienso irradiado, agua estéril, sistemas de filtración del aire y otras precauciones. Todo lo anterior complica el desarrollo del modelo, por lo que se requieren estabularios dotados para la utilización de este tipo de animales, y un personal con formación especializada.

Este tipo de modelos se ha desarrollado principalmente con *C. albicans*, y en algunas ocasiones con *Candida tropicalis*<sup>26,27</sup>. Con esta última se han obtenido peores resultados en la colonización gastrointestinal y en la diseminación. Con otras especies de *Candida* apenas existen datos publicados. No obstante, las candidiasis sistémicas causadas por *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* y otras especies de levaduras no parecen tener un origen gastrointestinal, sino que su vía de infección suele ser la colonización de catéteres y sondas de los enfermos<sup>28</sup>. Con estos datos, no parece que tenga sentido el desarrollo de modelos de colonización gastrointestinal con estas especies de levaduras, y parece más razonable plantear el desarrollo de un modelo de los denominados *ex vivo*.

La necesidad de obtener una colonización sostenida, y tras ello causar una profunda inmunodepresión, hacen que la duración de los experimentos sea prolongada (6-8 semanas). De esta forma, las levaduras que diseminan desde el tracto gastrointestinal, alcanzan diferentes vísceras, se producen abscesos y numerosas levaduras se disponen en fase micelial. Con lo anterior

se intenta reproducir lo que ocurre en los enfermos inmunodeprimidos, pero tiene como consecuencia cierta inexactitud a la hora de valorar la diseminación. En la evaluación de la infección sistémica suele utilizarse el cultivo de las vísceras afectadas, expresándose los datos en UFC/g tejidos. Sin embargo, los cultivos sólo reflejan la presencia de levaduras en los tejidos, sin tener en cuenta si están en fase micelial o celular. La fase micelial de las levaduras se ha relacionado con su virulencia, ya que colabora en la invasión tisular y en la resistencia a los mecanismos de defensa del huésped<sup>4,29</sup>. Todo lo anterior tiene una trascendencia especial cuando este modelo se utiliza en la valoración de la profilaxis o en el tratamiento de la infección. La reducción en el número de UFC/g de tejido se interpreta como que la profilaxis o el tratamiento antifúngico analizado en el modelo tiene utilidad. Sin embargo, no suele tenerse en cuenta si en los tejidos siguen existiendo lesiones con levaduras en fase micelial. La reducción en el número de UFC puede ser un magnífico índice de eficacia en algunos casos, pero en otros pueden existir lesiones con organismos miceliales, cuyo cultivo rinde un escaso número de UFC, pero que está causando una infección grave que no responde al tratamiento. Actualmente no existe una solución satisfactoria para este problema, aunque algunos especialistas proponen la utilización de técnicas que intenten determinar antígenos de la fase micelial<sup>30</sup>, métodos de biología molecular (PCR)<sup>31,32</sup>, tinciones histológicas o estudios de imagen para seguir la evolución de las lesiones viscerales<sup>29</sup>.

### 3. Aplicaciones del modelo

En la tabla II se resumen las aplicaciones y avances que ha supuesto el modelo de colonización gastrointestinal y posterior diseminación, en el conocimiento de la candidiasis sistémica.

Estos modelos ofrecen la posibilidad de explorar la fisiopatología de la infección. *C. albicans* coloniza el tracto gastrointestinal de los humanos durante los primeros años de vida. Además, se ha aislado en alimentos, en objetos personales y en el medio hospitalario, por lo que son frecuentes las recolonizaciones. Las candidiasis sistémicas aparecen en enfermos con inmunodepresión y con factores que favorecen la diseminación. Entre estos últimos destacan tratamientos antibióticos que dañan la flora bacteriana gastrointestinal y las alteraciones de la mucosa digestiva. En definitiva, se produce un sobrecrecimiento de levaduras en la mucosa, se facilita su diseminación y la respuesta inmunitaria que podría controlar la infección se encuentra alterada<sup>4,7,29</sup>.

En estos modelos, se han estudiado los factores que pueden influir en la secuencia de la infección. Se conoce que existen factores de virulencia de las levaduras como adhesinas (mannanos)<sup>30</sup>, proteinasas y aspartil proteasas<sup>29</sup>, la presencia de propiedades hidrofóbicas o la tendencia a entrar en fase micelial que favorecen la adhesión e invasión de la mucosa gastrointestinal<sup>20</sup>. En los modelos pueden incluirse cepas que tengan alterados alguno de los factores y propiedades anteriores, y de esa forma se puede analizar su capacidad de producir una infección diseminada<sup>33,34</sup>. También se ha comprobado cómo las alteraciones de la flora bacteriana tanto aerobia como anaerobia, y la lesión que pueden causar los fármacos citostáticos sobre la mucosa ayudan a la colonización y diseminación<sup>16,17,21-23</sup>. Así mismo, se han analizado los distintos factores que intervienen en la respuesta inmunitaria para controlar la infección. Actualmente no se conoce con exactitud esta respuesta, pero se acepta que está constituida por un complejo mecanismo de interacciones humorales y celulares, en el que los linfocitos T desempeñan un papel primordial<sup>29</sup>. Existen modelos que utilizan ratones inmunodeprimidos mediante manipulación genética (*knock-out*, transgénicos, etc.), en los que se están analizando qué componentes de la inmunidad son los principales en el control de la candidiasis sistémica endógena<sup>7,18</sup>.

Sin embargo, estos modelos han sido utilizados con más profusión en los estudios que analizan la profilaxis y los tratamientos antifúngicos. Se han desarrollado distintos modelos para eva-

luar la eficacia de antifúngicos mediante análisis de supervivencia, medición de concentraciones farmacológicas o descenso de UFC en los tejidos<sup>7,9,33</sup>. Aunque en muchos de ellos se ha empleado la infección parenteral, es el modelo de colonización gastrointestinal, inmunosupresión y diseminación el que ofrece la posibilidad de examinar los diferentes parámetros que influyen en el desarrollo de la infección, y posteriormente, en la respuesta al tratamiento y en el control de la misma. En ellos se debe pautar el tratamiento antifúngico o la profilaxis intentando reproducir la situación de los enfermos inmunodeprimidos. Por ejemplo, un modelo profiláctico debería diseñarse con una pauta de antifúngicos que cubriera todo el período de tiempo en el que los animales se encuentran inmunodeprimidos.

Se han desarrollado diferentes estudios en los que se evalúan diferentes pautas profilácticas o terapéuticas<sup>10,14,34-36</sup>. También se pueden realizar valoraciones de nuevas moléculas (polienos lipídicos, equinocandinas, sordarinas, nuevos azoles, etc.)<sup>4,37</sup>. En la actualidad, este modelo es uno de los mejores métodos de los que se dispone para realizar estudios de correlación *in vitro-in vivo*. Así, se han llevado a cabo estudios inoculando aislamientos con resistencia *in vitro* al flucanazol o a la anfotericina B<sup>35</sup>. También se han analizado aislamientos secuenciales de enfermos en tratamiento antifúngico prolongado (infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana [VIH] con candidosis orofaríngea), que han ido desarrollando resistencia *in vitro* al antifúngico. Con estos aislamientos se ha valorado si existe una alteración en la virulencia de las cepas y su respuesta al tratamiento con antifúngicos ante los que presentaban resistencia *in vitro*<sup>36</sup>. También pueden diseñarse modelos en los que se trate a los ratones con dos moléculas antifúngicas, valorando el sinergismo de las mismas.

#### *Modelo de aspergilosis invasora*

En los últimos años se han desarrollado modelos animales que pretenden analizar la secuencia de infección de la aspergilosis invasora. Anteriormente, únicamente existían modelos experimentales de aspergilosis que se utilizaban para muestreos de antifúngicos, y modelos monoparamétricos que medían concentraciones de fármacos en fluidos orgánicos o descensos en las UFC tisulares tras el tratamiento antifúngico<sup>8,9</sup>. En ellos se inoculaban los animales, generalmente ratones (inmunodeprimidos o no), con una dosis letal del hongo, para en una segunda fase analizar la virulencia de las cepas o la invasión tisular.

Sin embargo, estos modelos aportan una información limitada, por lo que se han desarrollado modelos discriminatorios que examinan diferentes parámetros que influyen en la infección<sup>38-40</sup>. Estos modelos intentan reproducir una aspergilosis invasora. Su diseño ha sido posible gracias a un mayor conocimiento epidemiológico de la aspergilosis<sup>38</sup>. *A. fumigatus* coloniza el tracto respiratorio superior del ser humano mediante la inhalación de esporas del hongo. Es un organismo ubicuo, que se encuentra en cualquier medio. La secuencia de infección es muy variable, pero brevemente puede afirmarse que se desarrolla en enfermos colonizados que reciben un tratamiento inmunodepresor, y en pacientes inmunodeprimidos que se colonizan en el medio hospitalario<sup>5</sup>. Se han descrito varios modelos que intentan reproducir la secuencia mencionada. A continuación se describe, en líneas generales, la metodología que debe emplearse para desarrollar un modelo discriminatorio de aspergilosis invasora.

### 1. Descripción del modelo

**Animales de experimentación.** Pueden emplearse varios tipos de animales. Se han publicado modelos con ratones, ratas, cobayas, conejos, pavos, vacas, monos, pollos y patos. La mayoría de los modelos publicados utilizan ratones Swiss, aunque no existe acuerdo sobre su edad y género. Algunos autores señalan que la utilización de conejos o ratas facilita la inoculación por su mayor tamaño. Se deben utilizar animales libres de patógenos específicos. También existe la posibilidad de desarrollar el modelo en animales inmunodeprimidos mediante manipulación genética (ratones atímicos, ratones C5-deficientes, C57BL/6, BALB/c, CD2F1, etc.)<sup>8,38</sup>.

**Inoculación de los animales.** Para reproducir la vía de infección más habitual de la aspergilosis invasora los animales tienen que ser inoculados por el tracto respiratorio. El método más empleado es la inoculación intranasal, aunque se han descrito otras vías de infección. En la inoculación intranasal, los animales deben anestesiarse previamente mediante la inhalación de éter dietílico. Tras esto, se les aplican 25-50  $\mu$ l de una suspensión de suero salino con un 0,01 % de Tween 80 que contiene esporas de *A. fumigatus*. La cantidad de esporas con que cada animal es inoculado varía según las publicaciones ( $5 \times 10^2$ - $5 \times 10^4$ ), aunque los mayores porcentajes de infección e invasión se consiguen con los inóculos más elevados<sup>39,40</sup>.

El tamaño de los animales parece que influye directamente sobre la cantidad de inóculo necesario; así, la inoculación intranasal suele utilizarse en modelos desarrollados en ratones<sup>38</sup>. Su principal limitación es la falta de exactitud a la hora de evaluar qué cantidad de esporas alcanzan los pulmones de los animales. Por ello, se han desarrollado otros métodos, como la inoculación intralaringea y la punción transtraqueal. Son sistemas algo más cruentos que el intranasal, por lo que el porcentaje de mortalidad postinoculación es más elevado. Con estos dos últimos métodos la cantidad de inóculo es menor y, para facilitar la técnica, suelen emplearse animales de mayor tamaño que el de los ratones, siendo los conejos y las ratas los más utilizados.

**Inmunodepresión.** Los regímenes de inmunosupresión que se describen en estos modelos son también muy variados, y no existe una pauta estandarizada. La vía de administración puede ser la intraperitoneal o la intravenosa. En general, los animales empiezan a inmunodeprimirse con citostáticos 3 días antes de la inoculación, y a algunos modelos se les añaden corticoides. Las dosis de inmunosupresores son variables. A modo de indicación cabe citar que en el caso de la ciclofosfamida se emplean dosis de 150-200 mg/kg de peso, con metilprednisolona de 65-130 mg/kg de peso y con acetato de hidrocortisona de 112,5-200 mg/kg de peso. Otra posibilidad es la de inmunodeprimir a los animales sólo con corticoides intentando reproducir la secuencia de la aspergilosis de los enfermos que reciben corticoterapia prolongada<sup>40</sup>.

En la tabla III se resume el régimen de inmunosupresión del modelo de aspergilosis invasora con el que se trabaja en la Unidad de Micología del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III.

**Evaluación de la invasión tisular.** La valoración de la invasión tisular puede realizarse mediante el recuento de UFC en tejidos, los exámenes histológicos o la determinación de la antigenemia de *A. fumigatus*<sup>38</sup>. Con esto último se intenta relacionar la extensión de la enfermedad con diferencias en las concentraciones plasmáticas de antígenos fúngicos.

En los animales de experimentación, la aspergilosis invasora produce inmovilidad, letargo y disnea<sup>40</sup>. Cuando se observen estos síntomas, los animales deben sacrificarse, salvo que se esté evaluando la respuesta a un antifúngico, en cuyo caso se sacrificará a los animales en los que el fallo terapéutico sea evidente.

TABLA III  
PAUTA DE INMUNOSUPRESIÓN DEL MODELO DE ASPERGILOSIS INVASORA EMPLEADO POR LA UNIDAD DE MICOLOGÍA DEL CENTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA

Día del experimento*	Fármaco inmunodepresor	Dosis	Vía de administración
-3	Ciclofosfamida	150 mg/kg	Intraperitoneal
-1	Ciclofosfamida + metilprednisolona	150 mg/kg	Intraperitoneal
		75 mg/kg	Intraperitoneal
3	Ciclofosfamida	150 mg/kg	Intraperitoneal
6	Ciclofosfamida	150 mg/kg	Intraperitoneal
9	Ciclofosfamida	150 mg/kg	Intraperitoneal

\*El día 0 es el día de la inoculación.

Es importante tener en cuenta que los fármacos inmunodepresores pueden producir síntomas como inmovilidad y pérdida de peso. Por ello, se debe incluir en el experimento un grupo control sin inocular, pero al que se le aplican estos fármacos.

Una vez diseccionados los animales en condiciones asépticas se extraen los órganos que se desea analizar. Los pulmones y el cerebro son los órganos que deben examinarse indefectiblemente, aunque también pueden incluirse en el análisis los riñones, el hígado, el corazón y el bazo.

El recuento de UFC/g en los tejidos se realiza mediante cultivos cuantitativos de muestras tisulares. Este método es el que más difusión ha tenido en los modelos de aspergilosis. Pero como se ha señalado en el apartado anterior de "Modelo de candidiasis diseminada", la invasión tisular por hongos conlleva habitualmente la aparición de hifas, lo que no puede valorarse mediante los cultivos de órganos. Por ello, deben incluirse exámenes histológicos, que aportan una mayor información sobre la verdadera afectación de los órganos. En éstos, puede incluirse la determinación de antígenos en los tejidos supuestamente afectados<sup>38,41</sup>. Se conocen más de 100 antígenos de *A. fumigatus*, pero recientemente se ha demostrado que las concentraciones de quitina se relacionan directamente con la masa fúngica que invade los tejidos<sup>39</sup>. Determinaciones serológicas de este antígeno, o técnicas inmunohistoquímicas, pueden convertirse en los métodos más adecuados para valorar la infección y la respuesta a un tratamiento dado<sup>41</sup>. También se han propuesto métodos de detección de ADN en los tejidos y en el suero<sup>38</sup>. Su sensibilidad es muy elevada, pero con bajos valores predictivos. Es posible que si se desarrollan técnicas cuantitativas, la detección del ADN tenga un gran futuro.

No obstante, los métodos de análisis de la antigenemia de *A. fumigatus* que más se han de-

sarrollado son los que detectan hidratos de carbono del hongo, principalmente galactomananos<sup>41</sup>. Estas técnicas ofrecen la posibilidad de desarrollar estudios en los que se valora la extensión de la infección. Se emplean técnicas de ELISA que determinan las concentraciones de antígeno circulante, y pueden correlacionarse con la invasión tisular y la respuesta al tratamiento<sup>38</sup>.

## 2. Ventajas y limitaciones del modelo

Los modelos que utilizan la inoculación intravenosa y valoran la supervivencia de los animales o las UFC/g de tejido aportan datos sobre la respuesta al tratamiento o a la profilaxis, pero deben tomarse con prudencia, ya que no reproducen la secuencia de infección en humanos<sup>9</sup>. Los modelos que intentan reproducir la aspergilosis invasora imitando esta secuencia ofrecen la posibilidad de obtener una información de gran valor a la hora de comprender la fisiopatología de esta infección.

La inoculación a través del tracto respiratorio propicia que la invasión tisular se desarrolle de forma similar que en los enfermos inmunodeprimidos. Así, los parámetros que se analicen en el modelo pueden tener una utilidad práctica indudable. Además, es posible valorar los factores de virulencia y la respuesta inmunitaria del organismo, constituyendo un magnífico índice de correlación *in vitro-in vivo*<sup>38</sup>.

No obstante, los modelos de aspergilosis invasora desarrollados de esta forma presentan algunas limitaciones. Es esencial que sean realizados por personal experimentado, y que el estabulario disponga del material y de las condiciones necesarias para trabajar con ratones libres de patógenos y en los que se va a inducir una inmunodepresión intensa. Por ello, estos modelos no pueden ser mantenidos por muchos laboratorios de micología.

TABLA IV  
POSIBLES APLICACIONES DEL MODELO DE ASPERGILOSIS INVASORA

<i>Aplicaciones</i>	<i>Características sobre las que existen datos publicados</i>
Estudio de factores de virulencia	Adhesinas Pigmentos Moléculas tóxicas (gliotoxina, hemolisina) Enzimas Fase micelial
Análisis de la respuesta inmunitaria	Respuesta inmunitaria celular Macrófagos alveolares y respuesta inmunitaria inespecífica Respuesta inmunitaria humoral Posibilidad de estudiar ratones con alteraciones genéticas Moléculas inmunosupresoras del propio hongo
Valoración de moléculas antifúngicas	Estudios farmacocinéticos Modelos profilácticos Modelos terapéuticos Correlación <i>in vitro-in vivo</i> Modelos con nuevas moléculas
Aplicación con otras especies fúngicas	Estudios de sinergismo <i>Aspergillus</i> spp. <i>Fusarium</i> spp. <i>Scedosporium</i> spp., etc.

Otras limitaciones están relacionadas con la complejidad de la cadena de infección de la aspergilosis<sup>5,41</sup>. Los modelos que inoculan una gran cantidad de esporas del hongo a través del tracto respiratorio ocasionan en los animales una aspergilosis hiperaguda. Sin embargo, la aspergilosis es una enfermedad que se produce por la exposición repetida a pequeños inóculos de esporas, a una infiltración lenta de los tejidos y a una invasión de los mismos cuando existe inmunodepresión. Se han desarrollado modelos que intentan inocular un reducido número de conidias, y que éstas se mantengan durante semanas en los pulmones, con la intención de desarrollar lesiones inflamatorias crónicas. En este sentido existen modelos con ratones transgénicos en los que se consigue desarrollar una aspergilosis inoculando 50 esporas<sup>42</sup>, y un modelo en el que el hongo es inoculado en el interior de pequeñas esferas de agarosa, consiguiéndose que permanezca 6 semanas en los pulmones de los animales, para en una segunda fase inmunodeprimirlos e inducir una aspergilosis invasora<sup>43</sup>. Otros de los aspectos que influyen en el desarrollo de las aspergilosis invasora en humanos, y que es difícil explorar con los modelos discriminatorios, son las diferencias de virulencia entre las cepas. Así, con la utilización de inóculos tan elevados es arriesgado diseñar estudios que investiguen si

son cepas de origen endógeno o ambientales las que predominan en las aspergilosis pulmonares invasoras, si existen cepas colonizadoras y cepas patógenas o si pueden existir aspergilosis invasoras producidas por varias cepas<sup>38</sup>. Estas cuestiones no están aún resueltas en humanos, entre otras razones por la falta de técnicas de tipificación subespecífica totalmente estandarizadas<sup>41</sup>, pero parece obvio que los modelos discriminatorios que se han desarrollado hasta el momento no exploran estos acontecimientos.

### 3. Aplicaciones del modelo

Los modelos de aspergilosis invasora tienen varias aplicaciones. En la tabla IV se resumen las posibles utilidades de este modelo.

La reproducción en animales de la aspergilosis invasora puede emplearse para avanzar en el conocimiento de la fisiopatología de la infección. En primer lugar, tiene aplicaciones en los estudios que intentan descubrir factores de virulencia de este hongo. Se conocen varios factores de virulencia de *A. fumigatus*, algunos de los cuales se han investigado en modelos con cepas mutantes. Entre ellos destacan adhesinas, pigmentos, moléculas tóxicas (gliotoxina, hemolisina, etc.) y enzimas (proteasa alcalina, fosfolipasa, etc.)<sup>5,38-41</sup>.

También se puede analizar la respuesta inmunitaria del organismo, que se encuentra formada por complejas interacciones entre la respuesta inmunitaria específica y la inespecífica. Las células ciliadas bronquiales, los macrófagos alveolares y los linfocitos T parecen tener un papel predominante en esta respuesta inmunitaria. Existen estudios en los que consiguió inmunizar animales mediante la inoculación de dosis subletales de hongos; no obstante, no se desconoce la importancia de las inmunoglobulinas en la respuesta inmunitaria frente a la aspergilosis, aunque estudios como el anterior apoyan que la inmunoterapia puede ser un acercamiento a considerar en pacientes con alto riesgo de aspergilosis<sup>38-44</sup>.

Las alteraciones que producen distintos fármacos inmunosupresores en esta respuesta inmunitaria también son valorables con estos modelos. Así mismo, pueden analizarse moléculas inmunodepresoras de origen fúngico, las cuales parecen inhibir la fagocitosis<sup>41</sup>.

Las aplicaciones del modelo de más difusión son las que se refieren a la evaluación de moléculas antifúngicas<sup>8</sup>. Con la adición de un antifúngico en dosis profilácticas o terapéuticas al modelo de aspergilosis invasora puede valorarse si se controla o no la infección. Así, puede analizarse la respuesta al tratamiento de cepas resistentes *in vitro*, constituyendo un buen índice de correlación entre el laboratorio y la práctica clínica<sup>45,46</sup>. También pueden valorarse nuevas moléculas antifúngicas. Entre éstas destacan las presentaciones lipídicas de anfotericina B, nuevos azoles como el voriconazol y el Sch 565-92, o las equinocandinas<sup>47-50</sup>. Pueden incluirse también estudios de sinergismo. Así mismo, la inmunoterapia y la adición al tratamiento de factores estimulantes de colonias han sido analizadas en algunos modelos, denotando que pueden ser de utilidad en el futuro<sup>38</sup>.

Por último, el modelo puede emplearse con otras especies fúngicas que pueden tener una secuencia de infección parecida, como *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. y, obviamente, otras especies de *Aspergillus*<sup>51</sup>.

### Otros modelos de infección fúngica

#### 1. Modelos de vaginitis por *Candida*

Los primeros modelos de vaginitis por *C. albicans* datan de 1960. Fue uno de los escasos modelos animales de infección fúngica que se desarrollaron antes de los años ochenta. Existen muchos trabajos publicados con modelos de va-

ginitis por levaduras, pero puede considerarse que existen dos estandarizados, uno con ratones hembra y otro con ratas. En ambos se inocula la levadura con hispos<sup>52</sup>.

En estos modelos se ha comprobado la influencia de numerosos factores sobre la incidencia de la vaginitis. Así, las alteraciones del ciclo estrogénico, el uso de antibióticos de amplio espectro, la corticoterapia, los déficit de hierro o la diabetes se han relacionado con la vaginitis por *Candida*. También se ha analizado el uso de antifúngicos tópicos y sistémicos, y de antisépticos locales, por lo que han tenido un papel destacado en el proceso de estandarización del tratamiento de esta infección. Se han desarrollado, a su vez, modelos con otras especies de levaduras distintas de *C. albicans*, con los que se ha observado que sólo *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. glabrata* son capaces de producir infecciones vaginales. Actualmente, estos modelos se siguen empleando por su sencillez y accesibilidad, y se utilizan fundamentalmente para la valoración de nuevas moléculas antifúngicas y de factores de virulencia de *Candida* spp.<sup>52-54</sup>.

#### 2. Modelos *ex vivo*

Estos modelos se emplean para estudiar la adherencia de los agentes infecciosos a determinados cuerpos extraños, y para determinar la difusión del antifúngico al lugar de la infección. La estrategia más frecuente es instalar un dispositivo en el tejido subcutáneo, por lo que se emplean animales grandes (conejos Nueva Zelanda, perros o cerdos). El dispositivo puede ser un catéter al que se le aplica el inóculo, o un cuerpo extraño hueco en cuyo interior hay líquido que puede incluir un agente infeccioso<sup>9,55</sup>.

Las aplicaciones de estos modelos se encaminan a estudios de adherencia de levaduras y hongos miceliales que colonizan dispositivos vasculares, causando posteriormente una infección diseminada (*C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *Dipodascus capitatus*, etc.). También tienen utilidad en estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos que analicen la difusión del antifúngico hasta dispositivos huecos de fibrina y otros materiales porosos, y la actividad fungicida del mismo.

#### 3. Modelos de criptococosis

Hasta la aparición del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida), la criptococosis era una infección poco frecuente, que se había implicado en la etiología de micosis pulmonares crónicas, tanto en enfermos inmunocompetentes como en



inmunodeprimidos. Así mismo, la criptococosis diseminada con meningitis se había descrito en enfermos con graves alteraciones del sistema inmunitario. A finales de los años sesenta se publicaron los primeros modelos de criptococosis<sup>56</sup>.

Desde la aparición del sida la situación ha cambiado notablemente, lo que ha influido sobre el desarrollo de los modelos de criptococosis. Así, se han diseñado varios modelos, mayoritariamente en ratones o en ratas, que intentan analizar la secuencia de infección en los enfermos inmunodeprimidos. La vía de inoculación puede ser la intranasal, la parenteral o la punción pericraneal. Se han descrito modelos tanto con animales inmunodeprimidos como sanos. Estos modelos se han empleado en estudios que valoraban factores de virulencia, como grosor de la cápsula, morfología de la colonia, pigmentación, proteasas y susceptibilidad a los antifúngicos. También han servido para apoyar la búsqueda de tratamientos útiles, como el que hoy día se considera de elección, la anfotericina B más 5-fluorocitosina. Así mismo, tienen utilidad en el análisis de nuevas moléculas antifúngicas<sup>57,58</sup>.

#### 4. Modelos de neumocistosis

En 1966 se realizaron los primeros experimentos con animales y *Pneumocystis carinii*<sup>59</sup>. No obstante, su baja prevalencia en aquellos años y la necesidad de trabajar con cultivos celulares hicieron que los modelos con este microorganismo apenas se desarrollasen. Pero con el aumento en su prevalencia que ocasionó la aparición del sida, empezaron a desarrollarse modelos de neumocistosis, además de otras líneas de investigación que demostraron que este agente era un hongo<sup>60</sup>.

Los modelos actuales inoculan el hongo por vía intranasal o transtraqueal. Con la primera, algunos autores destacan la necesidad de un inóculo alto y de una inmunodepresión intensa para que aparezca la infección. Los modelos se han desarrollado con ratones, ratas, conejos y hurones. Los animales son tratados con corticoides, administrando la primera dosis unos días antes de la inoculación. También se han empleado ratones atímicos y con otras inmunodepresiones. Recientemente se ha publicado que los conejos son muy susceptibles a la neumocistosis, y que no necesitan inmunodepresión para desarrollar la infección<sup>61</sup>.

Existen modelos que se diseñan con la intención de analizar la progresión de la enfermedad en respuesta al tratamiento, sin necesidad de sacrificar a los animales. Plantean la toma de muestras respiratorias, y su examen, lo que resulta

muy difícil en animales de pequeño tamaño. Por ello, se han desarrollado modelos de esta infección en caballos, cerdos y primates que han demostrado ser muy susceptibles a la neumocistosis<sup>62</sup>.

No obstante, la mayoría de los modelos que analizan factores de virulencia, respuesta al tratamiento o profilaxis están diseñados con ratones atímicos o con ratas sanas tratadas con corticoides, modelos con los que se obtienen buenos resultados a la hora de reproducir la infección<sup>61-62</sup>.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Drouhet E. Historical introduction: evolution of knowledge of the fungi and mycoses from Hippocrates to the twenty-first century. En: Ajello L, Roderick JH, editores. Vol. 4. Medical mycology. En: Collier L, Balows A, Sussman M, editores. Topley & Wilson's Microbiology and microbial infections (9ª ed.). Londres: Arnold, 1988; 3-42.
2. Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. Clin Infect Dis 1995; 20: 1.526-1.530.
3. Perfect JR, Schell WA. The new fungal opportunists are coming. Clin Infect Dis 1996; 22 (Supl 2): 112-118.
4. Edwards JE, Jr. *Candida* species. En: Mandell GI, Bennett JE, Dolin R, editores. Principles and practice of infectious diseases (4ª ed.). Nueva York: Churchill Livingstone, 1995; 2.289-2.306.
5. Bennett JE. 1995. *Aspergillus* species. En: Mandell GI, Bennett JE, Dolin R, editores. Principles and practice of infectious diseases (4ª ed.). Nueva York: Churchill Livingstone, 1995; 2.306-2.311.
6. Zak O, Sande MA. Introduction: The role of animal models in the evaluation of new antibiotics. En: Zak O, Sande MA, editores. Experimental models in antimicrobial chemotherapy, Vol. 1. Londres: Academic Press, 1986; 1-6.
7. Cole GT, Halawa AA, Anaissie EJ. The role of the gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis: from the laboratory to the bedside. Clin Infect Dis 1996; 22 (Supl 2): 73-88.
8. Andriole VT, Minitzer P, George D, Kordick D, Patterson TF. Animal models: usefulness for studies of fungal pathogenesis and drug efficacy in aspergillosis. Clin Infect Dis 1992; 14 (Supl 1): 134-138.
9. Zak O, O'Reilly T. Animal models in the evaluation of antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 1.527-1.531.
10. Flattery AM, Abruzzo GK, Gill CJ, Smith JG, Bartalzy K. New model of oropharyngeal and gastrointestinal colonization by *Candida albicans* in CD4+ T-cell-deficient mice for evaluation of antifungal agents. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 1.604-1.609.
11. Herrera C, Guentzel MN. Mice with persistent gastrointestinal *Candida albicans* as a model for antifungal therapy. Antimicrob Agents Chemother 1982; 21: 51-53.

12. Lacasse M, Fortier C, Chakir J, Cote L, Deslauriers N. Acquired resistance and persistence of *Candida albicans* following oral candidiasis in the mouse: a model of the carrier state in humans. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8: 313-318.
13. Pope LM, Cole GT, Guentzel MN, Berry LJ. Systemic and gastrointestinal candidiasis of infant mice after intragastric challenge. *Infect Immun* 1979; 25: 702-707.
14. Turner JR, Butler TF, Johnson ME, George RS. Colonization of the intestinal tract of conventional mice with *Candida albicans* and treatment with antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1976; 9: 787-792.
15. Walsh TJ, Pizzo PA. Experimental gastrointestinal and disseminated candidiasis in immunocompromised animals. *Eur J Clin Epidemiol* 1992; 8: 477-483.
16. Kennedy MJ, Volz PA. Ecology of *Candida albicans* gut colonization: inhibition of *Candida* adhesion, colonization, and dissemination from the gastrointestinal tract by bacterial antagonism. *Infect Immun* 1985; 49: 654-663.
17. Ekenna O, Sherertz RJ. Factors affecting colonization and dissemination of *Candida albicans* from the tracto-intestinal tract of mice. *Infect Immun* 1987; 55: 1.558-1.563.
18. Narayanan R, Joyce WA, Greenfield RA. Gastrointestinal candidiasis in a murine model of severe combined immunodeficiency syndrome. *Infect Immun* 1991; 59: 2.116-2.119.
19. Samonis G, Anaissie EJ, Rosenbaum B, Bodey GP. A model of sustained gastrointestinal colonization by *Candida albicans* in healthy adult mice. *Infect Immun* 1990; 58: 1.514-1.517.
20. Vargas SL, Patrick CC, Ayers GD, Hughes WT. Modulating effect of dietary carbohydrate supplementation on *Candida albicans* colonization and invasion in a neutropenic mouse model. *Infect Immun* 1993; 61: 619-626.
21. Helstrom PB, Balish E. Effect of oral tetracycline, the microbial flora and the athymic state on gastrointestinal colonization and infection of BALB/c mice with *Candida albicans*. *Infect Immun* 1979; 23: 764-774.
22. Samonis G, Anastassiadou H, Dassiou M, Tselentis Y, Bodey GP. Effects of broad-spectrum antibiotics on colonization of gastrointestinal tracts of mice by *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 602-603.
23. Greenfield RA, Joyce WA. Gastric colonization with *Candida albicans*. *Mycopathologia* 1993; 122: 1-5.
24. Guentzel MN, Herrera C. Effects of compromising agents on candidosis in mice with persistent infection initiated in infancy. *Infect Immun* 1982; 35: 222-228.
25. Wells CL, Maddaus MA, Simmons R. Proposed mechanism for the translocation of intestinal bacteria. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 958-979.
26. De Repentigny L, Phaneuf M, Mathieu LG. Gastrointestinal colonization and systemic dissemination by *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in intact and immunocompromised mice. *Infect Immun* 1992; 60: 4.907-4.914.
27. Wingard JR, Dick JD, Merz WG, Sandford GR, Burns WH. Pathogenicity of *Candida tropicalis* and *Candida albicans* after gastrointestinal inoculation in mice. *Infect Immun* 1980; 29: 808-813.
28. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Hollis RJ, Messer SA et al. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: Frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY program. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1.886-1.889.
29. Segal E, Elad D. *Candida* species and *Blastoschizomyces capitatus*. En: Ajello L, Roderick JH, editores. Vol. 4. Medical mycology. En: Collier L, Balows A, Sussman M, editores. Topley & Wilson's Microbiology and microbial infections (9ª ed.). Londres: Arnold, 1998; 423-460.
30. Mitsutake K, Miyazaki T, Tashiro T, Yamamoto Y, Kakeya H, Otsubo T et al. Enolase antigen, mannan antigen Cand-tec antigen, and B-glucano in patients with candidemia. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1.918-1.921.
31. Van Deventer AJM, Goessens WHF, Van Belkum A, Van Etten EWM, Van Vliet HJA, Verbrugh HA. PCR monitoring of response to liposomal amphotericin B treatment of Systemic candidiasis in neutropenic mice. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 25-28.
32. Díaz-Guerra TM, Martínez-Suárez JV, Laguna F, Valencia E, Rodríguez-Tudela JL. Change in fluconazole susceptibility patterns and genetic relationship among oral *Candida albicans* isolates. *AIDS* 1998; 12: 1.601-1.610.
33. Ashman RB, Fulurija A, Papadimitriou JM. Strain-dependent differences in host response to *Candida albicans* infection in mice are related to organ susceptibility and infectious load. *Infect Immun* 1996; 64: 1866-1869.
34. Ghannoum MA, Spellberg B, Saporito-Irwin SM, Fonzi WA. Reduced virulence of *Candida albicans* PHR1 mutants. *Infect Immun* 1995; 63: 4.528-4.530.
35. Barchiesi F, Najvar LK, Luther MF, Scalise G, Rinaldi MG, Graybill JR. Variation in fluconazole efficacy for *Candida albicans* strains sequentially isolated from oral cavities of patients with AIDS in an experimental murine candidiasis model. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 1.317-1.320.
36. Beker JM, Henry LK, Jiang W, Koltin Y. Reduced virulence of *Candida albicans* mutants affected in multidrug resistance. *Infect Immun* 1995; 63: 4.515-4.518.
37. Belanger P, Nast CC, Fratti R, Sanati H, Ghannoum M. Voriconazole (UK-109,496) inhibits the growth and alters the morphology of fluconazole-susceptible and -resistant *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1.840-1.842.
38. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 310-350.
39. Mellado E, Aufauvre-Brown A, Gow NAR, Holden DW. The *Aspergillus fumigatus* chsC and chsG genes encode class III chitin synthases with different functions. *Mol Microbiol* 1996; 20: 667-679.

40. Tang CM, Cohen J, Krause T, Van Noordens S, Holden DW. Alkaline protease of *Aspergillus fumigatus* is not a virulence determinant in two murine models of invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun* 1993; 61: 1.650-1.656.
41. Richardson MD. *Aspergillus* y *Penicillium* species. En: Ajello L, Roderick JH, editores. Vol. 4, Medical mycology. En: Collier L, Balows A, Sussman M, editores. Topley & Wilson's Microbiology and microbial infections (9ª ed.). Londres: Arnold, 1998; 281-313.
42. Nawada R, Amitani R, Tanaka E, Niimi A, Suzuki K, Murayama T et al. Murine model of invasive pulmonary aspergillosis following a earlier stage, noninvasive *Aspergillus* infections. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1.433-1.439.
43. Morgenstern DE, Gifford MAC, Li LL, Doerschuck CM, Dinauer M. Absence of respiratory burst in X-linked chronic granulomatous disease mice leads to abnormalities in both host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus*. *J Exp Med* 1997; 185: 207-218.
44. Cenci E, Mencacci A, Fe d'Ostiani C, Montagnoli C, Bacci A, Del Sero G et al. Cytokine- and T-helper-dependent immunity in murine aspergillosis. *Res Immunol* 1998; 145: 445-454.
45. Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, Anderson MJ, Manning NJ, Stevens DA et al. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1.364-1.368.
46. Denning DW, Radford SA, Oakley KL, Hall L, Johnson EM y Warnock DW. Correlation between in-vitro susceptibility testing to itraconazole and in-vivo outcome of *Aspergillus fumigatus* infection. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40: 401-414.
47. George D, Minitier P, Andriole VT. Efficacy of UK-109,496, a new azole antifungal agent, in an experimental model of invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 86-91.
48. Martin MV, Yates J, Hitchcock CA. Comparison of voriconazole (UK-109,496) and itraconazole in prevention and treatment of *Aspergillus fumigatus* endocarditis in guinea pigs. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 13-16.
49. Petraitis V, Petraitiene R, Groll AH, Bell A, Callender DP, Sein T et al. Antifungal efficacy, safety, and single-dose pharmacokinetics of LY303366, a novel echinocandin B, in experimental pulmonary aspergillosis in persistently neutropenic rabbits. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2.898-2.905.
50. Verweij PE, Oakley KL, Morrisey J, Morrisey G, Denning DW. Efficacy of LY3033666 against amphotericin B-susceptible and -resistant *Aspergillus fumigatus* in a murine model of invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 873-878.
51. Odds FC, Van Gerven F, Espinel-Ingróff A, Barlett MS, Ghannoum MA, Lancaster MV et al. Evaluation of possible correlations between antifungal susceptibilities of filamentous fungi *in vitro* and antifungal treatment outcomes in animal infection models. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 282-288.
52. Polak A. Experimental *Candida* vaginitis (vaginal thrush). En: Zak O, Sande MA, editores. Experimental models in antimicrobial chemotherapy. Vol. 2. Londres: Academic Press, 1986; 21-41.
53. De Bernardis F, Arancia S, Morelli L, Hube B, Sanglard D, Schafer W et al. Evidence that members of the secretory aspartyl proteinase gene family, in particular SAP2, are virulence factors for *Candida* vaginitis. *J Infect Dis* 1999; 179: 201-208.
54. Fidel PL Jr, Cutright JL, Sobel JD. Efficacy of D0870 treatment of experimental *Candida* vaginitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1455-1459.
55. Zimmerli MP, Waldvogel FA. Models of foreign-body infections. En: Zak O, Sande MA, editores. Experimental models in antimicrobial chemotherapy. Vol. 1. Londres: Academic Press, 1986; 295-318.
56. Gaybrill JR. Animal models for treatment of cryptococcosis. En: Zak O, Sande MA, editores. Experimental models in antimicrobial chemotherapy. Vol. 3. Londres: Academic Press, 1986; 131-148.
57. Fries BC, Casadevall A. Serial isolates of *Cryptococcus neoformans* from patients with AIDS differ in virulence for mice. *J Infect Dis* 1998; 178: 1.761-1.766.
58. Najvar LK, Bocanegra R, Graybill JR. An alternative animal model for comparison of treatments for cryptococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 413-414.
59. Walzer PD. *Pneumocystis carinii* infection. En: Zak O, Sande MA, editores. Experimental models in antimicrobial chemotherapy. Vol. 3. Londres: Academic Press, 1986; 185-202.
60. Stringer JR. *Pneumocystis carinii*: what is it, exactly? *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 489-498.
61. Cere N, Polack B. Animal pneumocystosis: a model for man. *Vet Res* 1999; 30: 1-26.
62. Dei-Cas E, Brun-Pascaud M, Bille-Hansen V, Allaert A, Aliouat EM. Animal models of pneumocystosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998; 22: 163-168.

## DISCUSIÓN

J. GAVALDA: Si al hablar de los modelos de infección bacteriana ya se habían planteado muchas dudas y habían surgido algunas discusiones, creo que ahora con modelos de infección fúngica la situación es todavía más extrema. Podemos partir, por ejemplo, del modelo de aspergilosis que se parece bastante a lo que sucede en el enfermo sometido a un trasplante, con inmu-

nosupresión con corticoides y una infección invasora con una mortalidad del 100 % en 10 o 15 días. Pero si a la hora de evaluar los resultados en el modelo de infección bacteriana nos basamos en el cultivo cuantitativo, para el tipo de infecciones que discutimos ahora esto no sirve. Ni los estudios histológicos, ni las técnicas de imagen en animal pequeño, ni escáneres de

alta resolución nos permiten solucionar el problema, por la limitaciones que suponen. Probablemente en todos estos estudios creo que el único punto final de evaluación que puede haber es el aumento de supervivencia o la curación final. En segundo lugar, me gustaría añadir que en el tema de la aspergilosis experimental, cuando se habla de diferentes tipos de inmunosupresión, creo que hay que diferenciar entre inmunosupresión por corticoides y neutropenia. Se trata de dos enfermedades diferentes y, por tanto, de dos modelos totalmente diferentes y que, probablemente, todos los estudios que se hacen y se hagan en el futuro tienen que contemplar el trabajar con los dos modelos por separado sin intentar extrapolar los resultados de uno a otro.

M. CUENCA-ESTRELLA: No tiene nada que ver un modelo con otro. Con el modelo de aspergilosis tenemos menos experiencia; hemos realizado experimentos muy preliminares y la inoculación intranasal nos ha funcionado bien, aunque no hemos hecho ninguna valoración histológica ni de otro tipo, porque estamos planteando utilizar un modelo parecido a la aspergilosis pero para otros patógenos fúngicos. Con *Candida* sí tenemos experiencia y creo que no tiene nada que ver en muchos aspectos con los hongos miceliales, y además no son dos infecciones comparables. Como has comentado, los modelos que, con resonancia magnética nuclear, evalúan la fase micelial en los tejidos y constatan cómo va disminuyendo, están fuera del alcance de la mayoría de laboratorios. Por ello, actualmente se está empezando a plantear para el modelo de la aspergilosis la medición de la quitina. Ésta parece ser que está relacionada con la cantidad de hifas que produce una determinada cepa de *Aspergillus*. De hecho, han aparecido algunas publicaciones del laboratorio de *Aspergillus* del Instituto Pasteur, en las que el descenso de quitina sería una constatación de que el animal estudiado está respondiendo al tratamiento.

M. DOMINGO: Por si os puede servir como modelo, la especie aviar y el pollo doméstico, en concreto, ha demostrado ser altamente susceptible a la aspergilosis sin necesidad de inmunodepresión previa. En la incubadora y entre el primer y tercer días de vida adquieren por vía aérea la infección en masa, y desencadenan espectaculares modelos de aspergilosis con entrada por vía sanguínea y visualización histológica de hifas en los vasos, en la circulación, invasión pulmonar masiva, etc.

M. CUENCA-ESTRELLA: Sobre modelos de aspergilosis hay muy poco publicado, nada estandarizado y, fundamentalmente, casi todo el mundo empezó a hacerlo en ratones, probablemente por razones logísticas, mientras que en la actualidad se está ensayando también en ratas y conejos. Aunque no he leído nada sobre este modelo en especie aviar y por esta vía, es un comentario a tener en cuenta.

J.L. RODRÍGUEZ TUDELA: Bajo mi punto de vista está claro que necesitamos un modelo de inmunodepresión, puesto que es la patología que tenemos en humanos, lo que limita que se pueda emplear un modelo con aves sin inmunosupresión. El otro problema comentado y tremendamente grave, incluso con *Candida*, es el recuento de UFC, por ejemplo; en el modelo del absceso en muslo de ratón, si bien se observa que el absceso es mucho más grande en el muslo no tratado que en el tratado, después de cultivar ambos muslos se pueden obtener las mismas UFC por g de tejido. Por tanto, no hay manera de interpretar los resultados, a menos que, como hace el grupo de investigación de Glaxo, y lo tiene más o menos a punto, se empleen sofisticadas técnicas de imagen. Pero se encarece de tal manera el modelo que lo hace inviable para la mayoría de grupos de investigación. Con respecto a esos problemas, los modelos de patología que ha estudiado Jean Paul Latge con *Aspergillus* con dos genes interrumpidos, se ha demostrado que no son útiles. Incluso con dos genes interrumpidos *A. fumigatus* mata igual que sin ellos. De ahí se puede deducir lo difícil que va a ser trabajar con este microorganismo y que probablemente, como se ha mencionado anteriormente para la medida de la eficacia terapéutica, la supervivencia, sea la salida más corta o la más fácil.

J. PACHÓN: Has comentado que evaluáis la sintomatología de los animales durante el experimento, aunque creo que alguna de las sintomatologías son difíciles de valorar. ¿El sacrificio se hace en tiempos preestablecidos o en función de dicha sintomatología?

M. CUENCA-ESTRELLA: Cuando el ratón está afectado por candidiasis sistémica es facilísimo identificar su sintomatología típica: el animal ha perdido peso, está prácticamente inmóvil, tiene el pelo erizado y se diferencia claramente de los controles sanos y de los controles inmunodeprimidos, aunque el propio régimen inmunodepresor produce pérdida de peso y algún otro síntoma. Resulta difícil llegar a la sexta dosis de inmunodepresión, que sabemos que provoca un nivel de polimorfonucleares por debajo del

10%. En estas circunstancias y con esta sintomatología todos los ratones son sacrificados, salvo que se vaya a valorar la posible respuesta terapéutica. Muy pocos animales con esta sintomatología no presentan candidiasis diseminada. El resto de animales sin sintomatología después de la sexta dosis de inmunodepresión se mantienen durante 15-20 días hasta el final del experimento, cuando se sacrifican y se analizan todas sus vísceras. Durante esos 15-20 días se mantienen dosis de inmunodepresión con valores de polimorfonucleares inferiores al 10%, con lo que conseguimos un modelo de inmunodepresión crónica con una candidiasis que se convierte en subcrónica y que es bastante difícil de evaluar. Pero hasta este momento estamos contentos porque el 60% de los ratones tienen candidiasis diseminada y en muy pocas ocasiones presentan infecciones bacterianas asociadas.

J.L. RODRÍGUEZ TUDELA: La verdad es que sabemos muy poco del modelo. Estamos aprendiendo todavía y tenemos más dudas que respuestas. Creo que debemos trabajar todavía mucho, porque se trata de un modelo muy pesado, y habrá que definir claramente, sobre todo para valorar la eficacia terapéutica, cuáles son las variables finales.

A. PAHISA: Como ya se ha matizado anteriormente, es importante destacar y separar dos grandes grupos de aspergilosis que son muy diferentes entre sí: la del trasplantado o inmunodeprimido y la del paciente neutropénico. A partir de ahí, realmente lo que interesa desde el

área de medicina es obtener conclusiones del tipo de aspergilosis que más nos preocupa en la práctica clínica: es decir, de la aspergilosis en paciente inmunodeprimido, porque sabemos que mata casi a la totalidad de los enfermos. No nos interesa, por tanto, la colonización aspergilar de un amplio grupo de personas sino la aspergilosis de comportamiento hiperagudo y de elevada mortalidad. Por ello somos partidarios del empleo del modelo por instilación transtraqueal que nos permite obtener una aspergilosis realmente masiva, que es la situación real, y es la responsable de la muerte de los pacientes. A partir de ahí, podremos estudiar diferentes posibilidades terapéuticas y alcanzar conclusiones prácticas para las verdaderas aspergilosis que nos preocupan en los hospitales.

M. CUENCA-ESTRELLA: Tengo mis dudas de si realmente la aspergilosis hiperaguda inducida por el inóculo en el ratón se asemeja fisiopatológicamente a lo que ocurre en humanos. Las últimas publicaciones al respecto sugieren otras posibilidades de interpretación. Parece ser que en los pacientes que desarrollan una aspergilosis invasora, anteriormente se podría haber producido una infección crónica que sería la responsable de las lesiones en el tejido pulmonar. Siguiendo esta interpretación, se está intentando desarrollar modelos experimentales en los que se pueda inocular muy poca cantidad de conídeas, incluso 50 conídeas, repetidas veces, hasta conseguir una lesión pulmonar; tras ello, se inmunodeprime al animal para desarrollar la aspergilosis invasora.

---

# Modelos de tuberculosis experimental

---

Pere-Joan Cardona<sup>a,c,\*</sup>, Vicenç Ausina<sup>a,c</sup> y Joan Caylà<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Servei de Microbiologia. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Badalona. Barcelona. <sup>b</sup>Servei d'Epidemiologia. Institut Municipal de la Salut. Barcelona. <sup>c</sup>Unidad de Investigación en Tuberculosis de Barcelona.

---

## RESUMEN

La infección por *Mycobacterium tuberculosis* puede provocar la enfermedad tuberculosa durante toda la vida del huésped en un 10 % de los infectados. Si bien los mecanismos que ocasionan la aparición de la enfermedad en el huésped no han sido todavía dilucidados, los diferentes modelos experimentales han proporcionado una gran información sobre la importancia de los macrófagos, el desarrollo de la inmunidad específica y la memoria inmune que permiten controlar a la infección. Los modelos experimentales también han permitido profundizar en el estudio de los mecanismos patogénicos en caso de reinfección o reactivación, así como en estudios de virulencia. De igual manera, estos modelos han sido imprescindibles en el diseño de pautas de profilaxis y de tratamiento, para abordar uno de los problemas más importantes que plantea el tratamiento antibiótico en esta enfermedad: la presencia de bacilos persistentes en las lesiones. De entre todos los modelos descritos, la utilización del modelo murino de tuberculosis es el que ha proporcionado un mayor conocimiento, tanto en la inmunopatología como en la profilaxis y el tratamiento de la misma.

### Palabras clave:

Tuberculosis experimental. Fisiopatología. Tratamiento.

---

## TUBERCULOSIS EXPERIMENTAL MODEL

Infection by *Mycobacterium tuberculosis* can induce tuberculous disease among 10 % of infected hosts. So far, mechanisms concerned in the development of the disease has not been yet elucidated, but experimental models have been providing useful information about the importance of macrophages, development of specific immunity and memory immunity that allow hosts to control the infection. Experimental models have allowed to study deepest pathogenic mechanisms of reinfection, reactivation, and in studies about virulence. Actually, these models have been absolutely necessary in figure out one of the paramount problems that represents the antibiotic treatment of this disease: the presence of persistent bacilli in lesions. Among all, the murine model of tuberculosis has been the one that has provide the deepest knowledge both in immunopathology and in profilaxis and treatment of tuberculosis.

### Key words:

Experimental tuberculosis. Pathogenesis. Therapy.

---

## Introducción

Cada año fallecen más personas a causa de la tuberculosis que debido a ninguna otra enfermedad infecciosa. Actualmente la mortalidad anual se sitúa en los 3.000.000 de personas, y se diagnostican 8.000.000 de casos nuevos cada año. Se ha estimado que un tercio de la población

mundial (aproximadamente 2.000.000.000 de personas) están infectadas, entre las cuales un 10 % desarrollará la enfermedad. Esta situación indujo en 1993 a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a reconocer que la tuberculosis era una "emergencia sanitaria global", siendo la primera ocasión en que una enfermedad se ha calificado de esta manera<sup>1</sup>. El hecho que la inci-

---

\*Correo electrónico: pcardona@ns.hugtip.scs.es.

dencia en España sea la más alta (después de Portugal) de los países desarrollados, con una incidencia estimada anual de 45 casos por 100.000 habitantes<sup>2</sup>, y que en España exista la tasa más elevada de síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) de los países desarrollados, con el riesgo correspondiente de la aparición de cepas multirresistentes<sup>3</sup>, hacen de nuestro entorno un área en la que el control de esta enfermedad constituye una prioridad absoluta.

### Historia natural de la tuberculosis humana

En la mayoría de los casos, la tuberculosis humana es el resultado de la inhalación de las gotas de Flügge que contienen *M. tuberculosis* y que se establecen en los alvéolos pulmonares donde son fagocitados por los macrófagos alveolares. El macrófago infectado puede destruir el bacilo, en el caso que esté previamente activado de manera inespecífica; en caso contrario, el bacilo es capaz de multiplicarse en el interior de los fagosomas y destruir posteriormente al macrófago. Los macrófagos infectados secretan diferentes citocinas para atraer a los neutrófilos y a nuevos macrófagos, que fagocitan a los bacilos presentes en el medio extracelular, así como para generar un foco inflamatorio. Mientras tanto, los bacilos se van diseminando hacia los nódulos linfáticos regionales y los vasos sanguíneos.

Como consecuencia de la infección primaria por *M. tuberculosis* se produce una diseminación sistémica bacilar, por un lado y, por otro, la formación de un "complejo primario" compuesto por una linfadenopatía hiliar, donde se origina la respuesta inmune específica y el foco infeccioso parenquimatoso (foco de Ghon) en el que se origina una lesión granulomatosa estructurada por una necrosis caseosa central, rodeada de macrófagos y células epitelioides, y externamente por linfocitos T. A medida que la lesión evoluciona, aparecen células multinucleadas de Langhans en el interior del granuloma.

La respuesta inmunitaria específica consta no tan sólo de la proliferación de linfocitos específicos T CD4 que activan a los macrófagos y los transforman en células epitelioides, capaces de destruir a los bacilos, sino también por el estímulo de una hipersensibilidad retardada de tipo IV, puesta de manifiesto con la prueba de la tuberculina.

En el 95 % de los casos, el "complejo primario" suele resolverse, pero en un 5 % puede originar una enfermedad primaria, ocasionando cuadros patológicos de diferente gravedad, desde pleuritis a tuberculosis miliar. En otro 5 % de

los infectados, puede originarse una enfermedad posprimaria durante toda la vida del huésped, a partir de la reactivación de focos infecciosos localizados en zonas anatómicas especialmente susceptibles (como el ápice pulmonar), establecidos durante la diseminación hematógena inicial y que habían permanecido en un estado persistente. En países en los que existe un alto riesgo de infección, este proceso puede originarse mediante reinfección.

En la enfermedad posprimaria, la respuesta inmunitaria y la formación de granulomas son similares a las observadas en la enfermedad primaria, con la diferencia de que la formación de tejido necrótico caseoso es mucho más importante, generando unas lesiones denominadas tuberculomas<sup>4</sup> que no permiten la diseminación linfática o sanguínea de los bacilos. El tejido caseoso es desfavorable para la multiplicación de los bacilos; por ello, para desencadenar la enfermedad en estas lesiones debe producirse el fenómeno de liquefacción del tejido caseoso, que se ha asociado al fenómeno de hipersensibilidad retardada<sup>5</sup>. El tejido liquefactado permite el crecimiento masivo de la población bacilar extracelular, provocando el incremento de la lesión y, en el pulmón, la erosión bronquial que induce la cavitación<sup>6</sup>. Las lesiones cavitadas reciben un gran aporte de oxígeno que permite que se incremente más la población bacilar<sup>7</sup>. Así pues, es posible establecer una relación entre la concentración bacilar y la presencia de infección o enfermedad en un huésped (fig. 1).

### Modelos animales de experimentación en tuberculosis

#### Aproximación histórica

En el estudio de la tuberculosis, se ha trabajado mayoritariamente en tres especies animales: el conejo, el cobaya y el ratón. El conejo es el animal en el que la tuberculosis se asemeja más a la evolución humana, puesto que es el único en el que se produce cavitación de las lesiones<sup>8,9</sup>. Los cobayas desarrollan una hipersensibilidad retardada muy intensa, y son más sensibles a *M. tuberculosis* que los humanos o los conejos<sup>9</sup>, lo que ocasiona, como en niños y en pacientes inmunodeprimidos, una enfermedad diseminada por vía hematógena, si bien no desarrollan lesiones cavitadas<sup>10</sup>. Los ratones presentan un grado de resistencia a *M. tuberculosis* similar al de los humanos, pero desarrollan una hipersensibilidad retardada de baja intensidad y sus lesiones no presentan necrosis ni cavitación<sup>11</sup>.

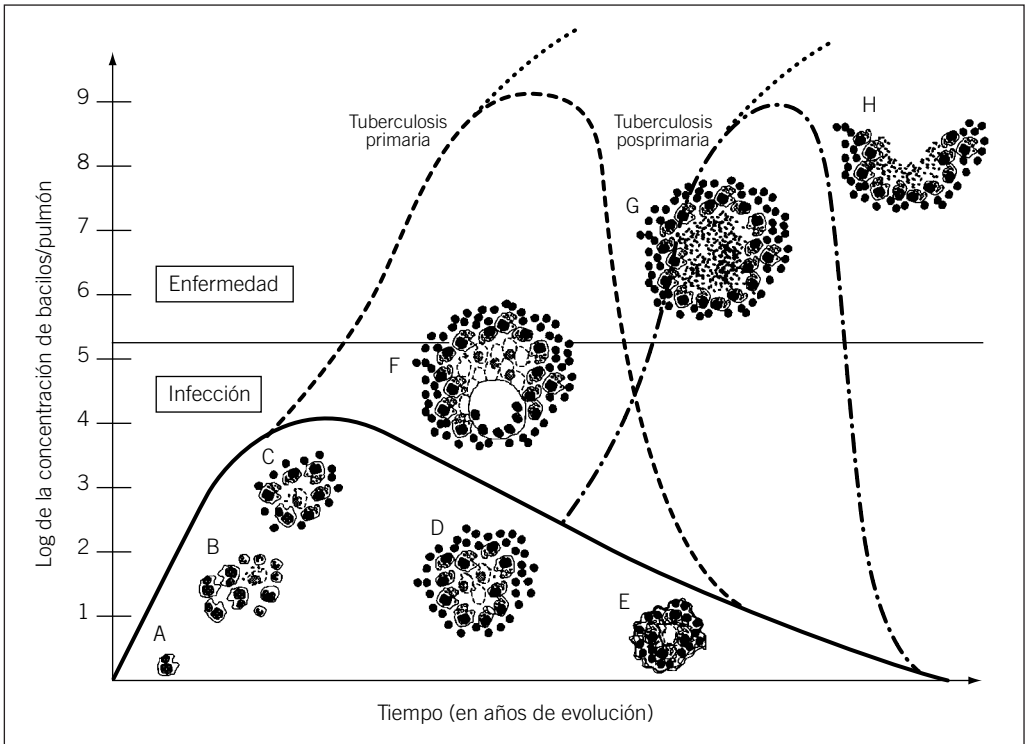


Fig. 1. Representación gráfica de la historia natural de la tuberculosis humana. Relación entre la histopatología y la concentración bacilífera en los tejidos. A: el bacilo entra en contacto con un macrófago alveolar; B: el bacilo se divide en el interior del macrófago al mismo tiempo que se atraen al foco infeccioso macrófagos y neutrófilos; C: adquisición de una inmunidad específica con la llegada de linfocitos capaces de activar a los macrófagos alveolares, inicio de la necrosis caseosa; D: formación de un granuloma caseoso; E: resolución del foco infeccioso mediante la esclerosis del granuloma; F: evolución hacia enfermedad, formación del tuberculoma a partir de una reinfección o de una reactivación (en esta figura se representa una célula de Langhans); G: liquefacción del granuloma e incremento masivo de la población bacilar; G: cavitación. La línea continua representa la evolución de la infección; las dos discontinuas representan la enfermedad primaria y la posprimaria que se resuelven; la línea de puntos representa la enfermedad que no se resuelve y finaliza con la muerte del huésped.

Los estudios iniciales sobre patología de la tuberculosis realizados por Robert Koch se llevaron a cabo en diferentes mamíferos. Posteriormente, el estudio de la tuberculosis se centró prácticamente en las experiencias del grupo de Max Lurie, utilizando cepas de *M. tuberculosis* y de *M. bovis* con diferentes grados de virulencia, y dos cepas de conejos (resistente y sensible)<sup>12,13</sup>. Estos estudios pusieron de manifiesto la importancia del macrófago y de la necrosis intragranulomatosa en el control de la infección por *M. tuberculosis*.

El año 1952, Middlebrook<sup>14</sup> publicó el diseño de un equipo para inducir infecciones por aerosol, proporcionando inóculos constantes y alta-

mente reproducibles a los animales (fig. 2). El diseño de este aparato fue de una gran importancia, puesto que, previamente, la utilización de aerosoles para provocar la infección había provocado muchos problemas de estandarización. A partir de este momento, los investigadores dispusieron de un instrumento eficaz para crear modelos de infección por la ruta que más imitaba las condiciones de infección en el huésped humano, si bien el peligro potencial, para el personal manipulador, de la creación de aerosoles en el laboratorio, ha hecho decantar a muchos grupos por la vía de inoculación intravenosa.

La alta sensibilidad del cobaya a *M. tuberculosis* ha provocado que este animal se haya utiliza-



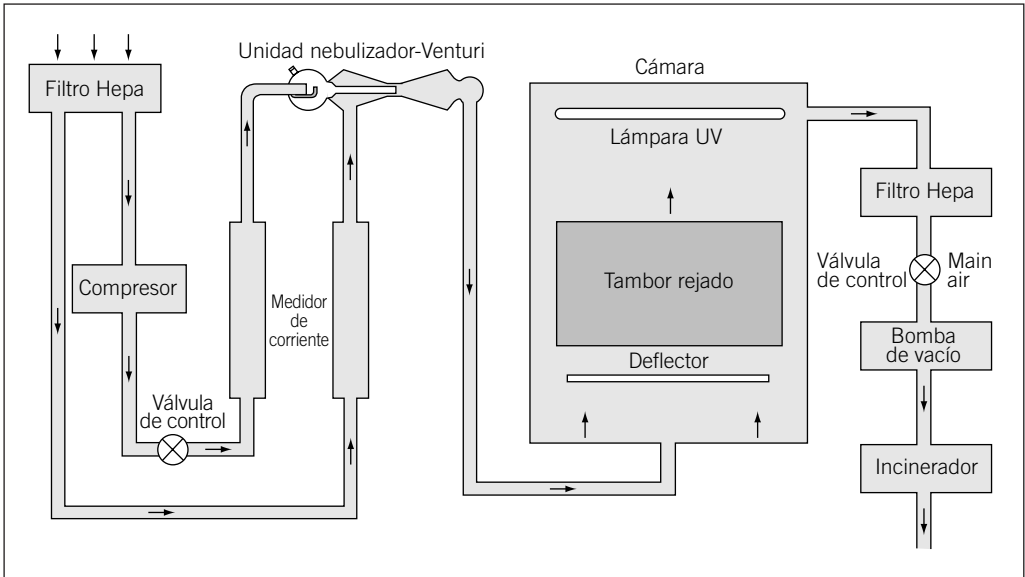


Fig. 2. Esquema de una máquina de Middlebrook. Diagrama del sistema de exposición por inhalación de Glas-Col. Esta máquina dispone de un tambor rejado donde se ubican hasta 125 ratones, un compresor de aire para generar el aerosol en el tubo de Venturi y un sistema de ventilación activado por una bomba de vacío, que permiten dosificar el inóculo. Así mismo este dispositivo tiene tres sistemas de seguridad: 1) filtros Hepa de entrada y salida de aire; 2) lámparas ultravioleta en la tapa superior de la máquina que se activan posteriormente a la finalización de la generación del aerosol para evitar contaminar al técnico que manipula la máquina al abrirla, y 3) por último, un incinerador a la salida del aire para destruir cualquier partícula en caso de fallo de los filtros Hepa.

do profusamente en laboratorios asistenciales para establecer la presencia de *M. tuberculosis* en las muestras patológicas antes de la aparición de medios de cultivo eficaces para el aislamiento de los bacilos<sup>15</sup>. También en este animal se realizaron los primeros estudios para establecer la capacidad virulenta de diferentes cepas de *M. tuberculosis*<sup>16</sup>, teniendo además una especial relevancia en la valoración de la eficacia de las diferentes vacunas para la tuberculosis<sup>17</sup>.

Entre los años 1960 y 1970 se empezaron a realizar los estudios clásicos sobre inmunidad en el ratón, animal en el que se estableció el concepto de "macrófago activado"<sup>18</sup>. A partir de entonces el estudio experimental de los mecanismos inmunológicos de las infecciones en general se empezó a realizar en este animal y los estudios en tuberculosis se centraron en el ratón en detrimento del cobaya, del que en realidad se dispone de muy poca información acerca de su sistema inmunológico. A partir de los años ochenta, los estudios inmunológicos experimentaron un gran auge con la aparición de las técnicas de biología molecular, la disposición de anticuerpos monoclonales, y de ratones transgénicos, pro-

porcionando una gran información sobre la red citocínica en la inmunopatología de la tuberculosis en el ratón<sup>19</sup>, de manera que los estudios en este animal han desplazado prácticamente a los del cobaya y del conejo.

### Descripción detallada del modelo de tuberculosis murina

A continuación se detallará el modelo de infección por aerosol y por inoculación intravenosa en el ratón, puesto que son los modelos más utilizados.

Se utilizan ratones hembra de 6 a 8 semanas de edad, libres de patógenos específicos (spf), del tipo C57Bl/6. La cepas de *M. tuberculosis* se cultivan en medio Proskauer-Beck, hasta una fase media logarítmica, y se conservan en alícuotas de 1 ml a -70 °C hasta su utilización, valorándose su concentración mediante el cultivo de diluciones seriadas en agar Middlebrook 7H11 a 37 °C con un 5% de CO<sub>2</sub>. Los ratones se infectan por exposición a un aerosol durante 45 min, mediante su ubicación en un aparato de infección tipo Middlebrook (Glas-col Inc., Terre Hau-

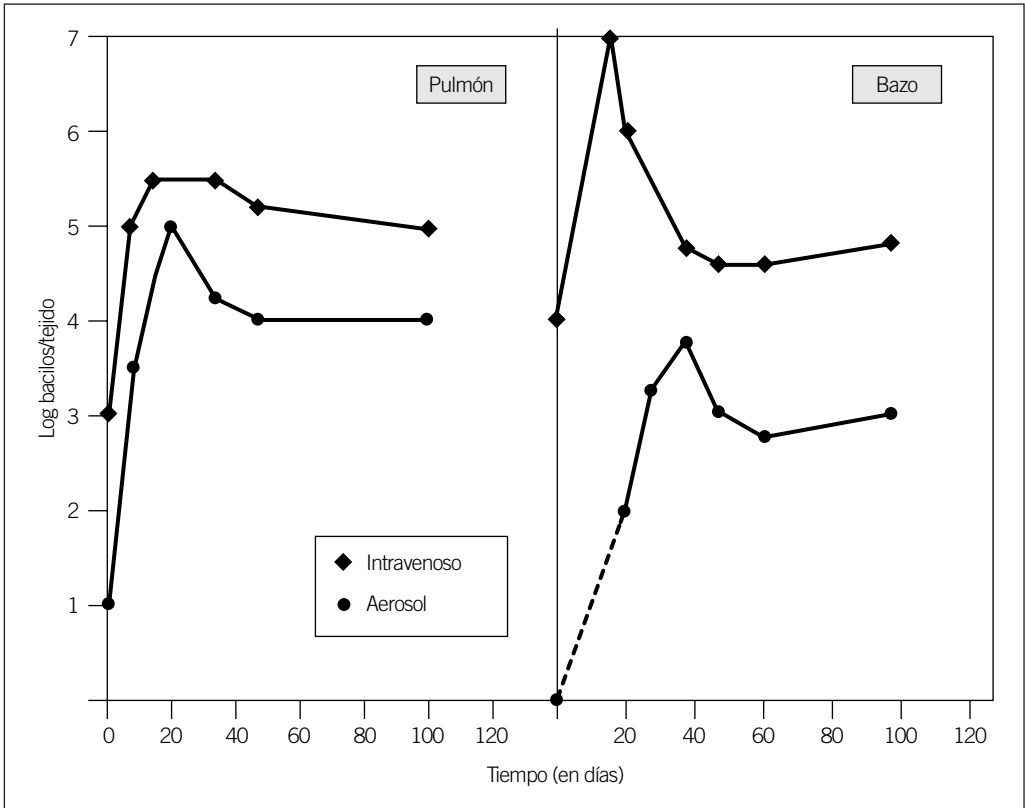


Fig. 3. Evolución de la infección por *M. tuberculosis* en el ratón, inoculando intravenosamente  $10^5$  bacilos viables o 20 bacilos viables mediante un aerosol.

te, IN), donde hay instalada una unidad de Venturi en la que se dispone un volumen de 10 ml de agua destilada que contiene  $10^7$  unidades formadoras de colonias (UFC), lo que proporciona un inóculo aproximado de 10-50 bacilos viables en los pulmones de cada animal. En el caso de utilizarse la infección intravenosa, se inoculan 0,2 ml de suero fisiológico que contiene  $10^5$  UFC.

Para monitorizar la evolución de la infección (fig. 3), se sacrifican los animales, en grupos de cuatro, introduciéndolos en una cámara de CO. Las muestras se trituran mediante un homogeneizador de vidrio. El número de bacilos viables se determina incubando diluciones seriadas de homogeneizados de pulmón y bazo en agar Middlebrook 7H11 a 37 °C con un 5% de CO<sub>2</sub>. Para el estudio de la presencia de ARNm de diferentes citocinas, se homogeneiza un lóbulo pulmonar en un medio con inhibidores de ARNsas (Ultraspect) y se conserva a -70 °C hasta proce-

der a la extracción del ARNm mediante una técnica clásica utilizando alcohol isopropílico y cloroformo. Para el estudio histológico, se instila una solución de formalina en phosphate buffer sodium (PBS) salino en un lóbulo pulmonar y, posteriormente, se incluye en parafina para ser teñido por las técnicas de hematoxilina-eosina y Ziehl-Neelsen.

Si bien parece claro que el modelo que mejor reproduce la infección es el de la inoculación por aerosol, este modelo es realizado por un número muy reducido de laboratorios debido a la necesidad de disponer de un estabulario de alta seguridad para evitar el riesgo potencial que supone la creación de aerosoles por *M. tuberculosis*. La diferencia entre la inoculación por aerosol o por vía intravenosa es notable. North et al<sup>20</sup> objetivaron que en el primer caso la infección es mucho más agresiva para los animales, ocasionando una mortalidad precoz a partir del día 100 postinocu-

lación, mientras que en el segundo caso, los animales no morían, al menos hasta el día 200 postinoculación. Los autores señalaban que en la inoculación por aerosol había mucha más afectación del parénquima pulmonar, hecho que implicaría un mayor compromiso respiratorio. Nuestro grupo<sup>21</sup> ha corroborado este extremo, observando que en el modelo de inoculación por aerosol las lesiones granulomatosas son significativamente mayores a las del modelo por inoculación intravenosa, y que esto se debería a que la adquisición de la inmunidad y del control de la infección es más tardía en el modelo de la inoculación por aerosol, en contraposición al de inoculación por vía intravenosa, en el que la concentración de bacilos inicial es tan importante en el bazo ( $10^4$  UFC; fig. 3) que estimula la inmunidad específica rápidamente.

### Ventajas y limitaciones de tuberculosis murina

La utilización del modelo de tuberculosis experimental en el ratón posee numerosas ventajas:

1. La gran similitud con la especie humana en cuanto a resistencia ante *M. tuberculosis*.
2. El gran conocimiento de su sistema inmunológico y la gran disponibilidad en reactivos o ratones transgénicos defectivos en diferentes moléculas implicadas en la patogenia.
3. La posibilidad de poder infectar a un gran número de animales al mismo tiempo, en caso de utilizar una máquina de tipo Middlebrook, cuya capacidad es de 125 ratones, 25 cobayas o 5 conejos, disminuyendo el error de la utilización de varias tandas de inoculación.
4. La economía de espacio y mantenimiento. Por razones de seguridad ambiental, este modelo de infección debe llevarse a cabo en un laboratorio equipado con un sistema de ventilación en depresión; el problema del espacio es mucho más importante en el caso de utilizar animales como el cobaya o el conejo.

En cuanto a las desventajas del modelo cabe destacar la ausencia de necrosis intragranulomatosa y la generación de una hipersensibilidad retardada débil.

En general, cabe señalar que, independientemente de la especie animal que se utilice, la realización de los modelos de tuberculosis experimental se ha de llevar a cabo en instalaciones de seguridad tipo 3, es decir, equipadas con un equipo de ventilación en depresión y con filtros de alta eficacia, y en las que se han de tomar medidas

estrictas de esterilización de alimentos y de todo el material fungible utilizado en su interior, y de protección física del personal para evitar cualquier riesgo de contaminación ambiental por *M. tuberculosis*. En el caso de utilizar el modelo de infección por aerosol, hay que añadir el peligro potencial de la máquina de Middlebrook que si bien lleva tres sistemas de seguridad incorporados para evitar la contaminación ambiental (fig. 2), se tiene que añadir un cuarto sistema: la ubicación de la máquina en un compartimento dentro del laboratorio, para poder tomar precauciones en caso de observar cualquier anomalía en los sistemas de seguridad existentes, lo que evitaría, consiguientemente, cualquier riesgo de exposición accidental del personal técnico.

### Avances que han supuesto los modelos de tuberculosis en el conocimiento de la fisiopatología de este proceso infeccioso

La complejidad de la inmunopatología de la tuberculosis ha hecho y hace imprescindible la investigación de esta enfermedad mediante el uso de modelos experimentales en animales.

Los estudios de Lurie, en los que se han utilizado dos cepas de conejos con diferente grado de sensibilidad a la infección por *M. tuberculosis* (cepa sensible y cepa resistente), demostraron que la diferencia entre ambas cepas se debía al grado de resistencia innata de los macrófagos que, en el caso de los conejos resistentes, provocaba una destrucción del inóculo inicial de *M. tuberculosis* 20 veces más elevada que en los sensibles<sup>13</sup>. Posteriormente, utilizando la información proporcionada por este modelo, Dannenberg<sup>9</sup> ha establecido cinco fases, desde un punto de vista anatomopatológico, en este proceso infeccioso, destacando la importancia de la activación de los macrófagos por los linfocitos específicos y de la hipersensibilidad retardada (DTH) en la histopatología de la infección (fig. 4):

- I. *Inicio*: el macrófago alveolar fagocita al bacilo y lo destruye en caso de estar previamente activado.
- II. *Simbiosis*: en el caso de que el macrófago no pueda destruir al bacilo, éste se multiplica en su interior y se libera cuando este macrófago se destruye. A continuación, los bacilos son fagocitados por otros macrófagos alveolares o por monocitos inactivados, formándose un tubérculo primario y estableciéndose una relación simbiótica en que ni los bacilos destruyen a los macrófagos ni éstos a los bacilos. En esta fase se objetiva un crecimiento logarítmico de los bacilos.

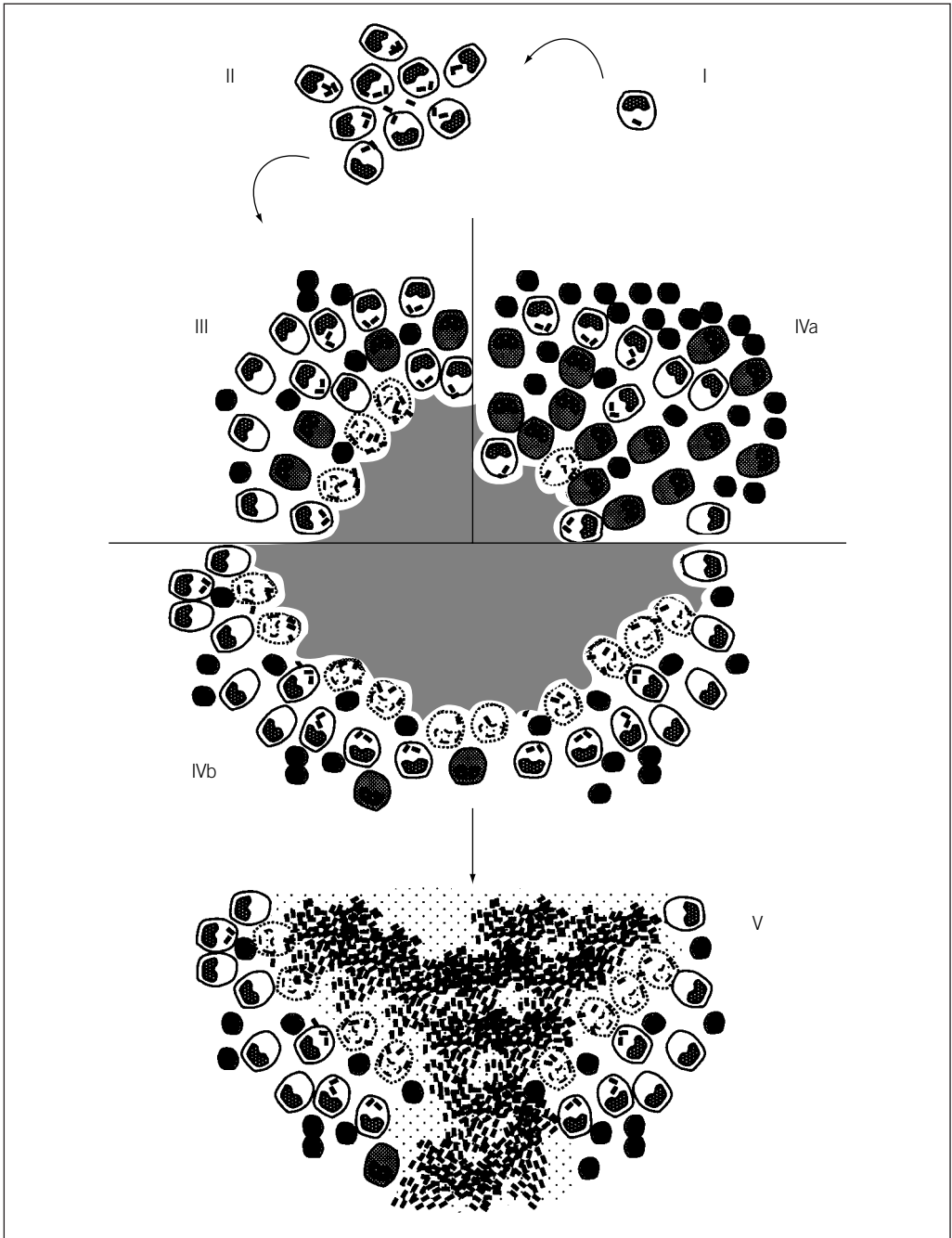


Fig. 4. Patogenia de la tuberculosis pulmonar experimental en conejos según Dannenberg (1994). I: fagocitosis del bacilo; II: simbiosis; III: necrosis caseosa inicial; IV: interacción entre destrucción de tejidos y activación de macrófagos, en los conejos resistentes (IVa) y sensibles (IVb); V: liquefacción y formación de cavidades. Los macrófagos activados están coloreados en gris, mientras que los destruidos se representan con una línea discontinua.

*III. Necrosis caseosa inicial:* esta fase se inicia cuando el crecimiento bacilar logarítmico se interrumpe, y coincide con el inicio de la necrosis caseosa y la aparición de la DTH que provoca la destrucción de los macrófagos no activados que contienen bacilos. Todavía no existe una respuesta inmunitaria, puesto que no hay macrófagos activados.

*IV. Interacción entre destrucción de tejidos y activación de macrófagos:* en esta fase se objetiva que los conejos resistentes (fase IVa) desarrollan una importante inmunidad celular que activa a los macrófagos, permitiéndoles destruir los bacilos que fagocitan, observándose una mayoría de macrófagos activados y poca necrosis en las lesiones granulomatosas. En el caso de los conejos sensibles (fase IVb) se objetivan una menor activación de los macrófagos y una mayor necrosis, debido a que presentan poca inmunidad celular y que en ellos sólo es efectivo el proceso de DTH.

*V. Liquefacción y formación de cavidades:* la liquefacción del tejido necrótico induce la proliferación extracelular de los bacilos, el aumento de las lesiones y la formación de cavidades.

La alta sensibilidad de los cobayas a la infección por *M. tuberculosis* y la facilidad de la diseminación hematógena de las infecciones han servido para estudiar el fenómeno de formación de lesiones metastásicas, junto con el de su reactivación y el de la naturaleza local de la inmunidad celular. Ho et al<sup>22</sup> constataron que infectando a cobayas mediante un aerosol, el inóculo inicial ocasionaba un cierto número de lesiones primarias en el pulmón. Este número de lesiones se incrementaba a la tercera semana postinoculación como consecuencia de la aparición de un nuevo tipo de lesiones incipientes, metastásicas, secundarias a la diseminación hematógena. Al realizar el seguimiento de la concentración de UFC en ambos tipos de lesiones, se constató que no seguían la misma evolución, puesto que mientras en las lesiones primarias la concentración de UFC se había controlado, en las metastásicas seguía incrementándose. Así pues, los bacilos que se establecían durante la bacilemia se multiplicaban en los focos metastásicos hasta conseguir una concentración determinada de antígenos con la que poder estimular la inmunidad y activar a los macrófagos en cada foco infectivo.

Posteriormente, en este mismo modelo Smith et al<sup>23</sup> demostraron en un estudio comparativo que las cepas de *M. tuberculosis* menos virulentas no tenían capacidad para ocasionar lesiones secundarias metastásicas. Pudieron demostrar la

teoría de que los bacilos con baja capacidad virulenta generan la enfermedad en el foco inicial de infección, razonamiento que contradecía la opinión generalizada que establecía que la tuberculosis pulmonar se originaba exclusivamente a partir de la reactivación de focos metastásicos, si bien este tipo de evolución se generaría en entornos con un gran riesgo de infección, puesto que harían falta muchas infecciones para que el foco generador de la enfermedad se situara en una localización susceptible al desarrollo de un tuberculoma, como el ápice pulmonar.

El modelo de tuberculosis murina ha permitido explorar y obtener una visión más clara de la inmunopatogenia de esta infección<sup>24</sup>. Este grupo de investigadores considera que hay dos fases: una protectora y una de control (fig. 5):

*I. Fase protectora:* los linfocitos T CD4 vírgenes reconocen a los epitopos de proteínas secretadas/exportadas por los bacilos que se multiplican en el interior del fagosoma del macrófago infectado, unidas a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II. Estos linfocitos se transforman en linfocitos de tipo Th1 bajo la influencia de la interleucina 12 (IL-12) secretada por los macrófagos infectados. Los linfocitos Th1 se caracterizan por secretar un patrón determinado de citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que permite la llegada de más macrófagos al foco infeccioso, y el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) que activa a los macrófagos infectados y permite la destrucción de los bacilos. En esta fase también participan los linfocitos T  $\gamma\delta$ , que ayudan a la activación de los macrófagos mediante la secreción de IFN- $\gamma$  y a la proliferación de los linfocitos Th1 mediante la síntesis de IL-2. Así mismo, mediante la secreción de IL-12, el macrófago estimula las células *natural killer* (NK), que también sintetizan IFN- $\gamma$ .

*II. Fase de control:* a medida que la infección progresa, los linfocitos Th1 específicos empiezan a desaparecer (tienen una vida media corta) y aparecen células de larga duración, cuya misión sería evitar la diseminación mediante el reconocimiento de focos nuevos. De esta manera, los linfocitos T efectores de la hipersensibilidad retardada (DTH), al reconocer una amplia gama de antígenos micobacterianos, provocan respuestas granulomatosas. Otros linfocitos T CD4 tienen funciones citolíticas, y son capaces de destruir macrófagos muy infectados; también se ha demostrado la presencia de linfocitos T CD8, que destruirían a células no fagocíticas (como las células endoteliales) infectadas mediante la presentación de antígenos asociados a moléculas del

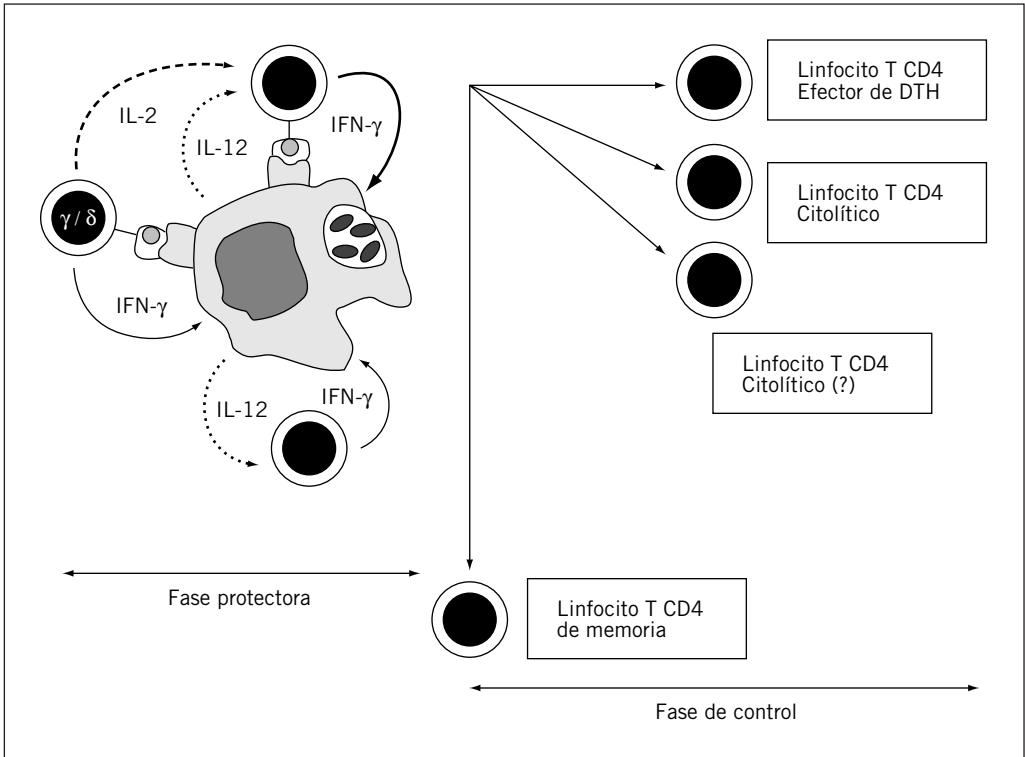


Fig. 5. Respuesta protectora en el modelo de tuberculosis murina según Orme.

CMH de clase I. Así mismo, se ha demostrado la presencia de linfocitos T CD4 de memoria capaces de iniciar rápidamente la activación de los macrófagos infectados en caso de reinfección.

En la respuesta inmunitaria ante *M. tuberculosis* también se ha podido demostrar que se produce una alternancia en el subtipo de linfocito T que responde ante la infección por *M. tuberculosis*, de manera que, posteriormente a la aparición de los linfocitos Th1, capaces de activar a los macrófagos infectados mediante el IFN- $\gamma$ , y que coincide con el período de control de la infección, aparece un segundo tipo de linfocito efector: el Th2<sup>25</sup> (fig. 6). Este subtipo se caracteriza por secretar IL-4 y estaría sensibilizado por antígenos de los bacilos “destruidos” que se han acumulado como consecuencia de la destrucción del 90 % de la concentración bacilífera (fig. 3) ocasionada por la activación de los macrófagos infectados. La emergencia del subtipo Th2 antagoniza con el Th1, bloqueando la destrucción de bacilos y ayudando a establecer una infección crónica<sup>24</sup>.

### Avances que ha supuesto el modelo experimental en la profilaxis y el tratamiento de las infecciones

El tratamiento de la tuberculosis humana ha de resolver dos problemas principales: a) la aparición de mutantes naturales a los antibióticos entre la población bacilífera extracelular de las lesiones cavitadas, que tiene una alta velocidad de crecimiento, y b) la recaída de la infección como consecuencia de la presencia de bacilos persistentes en las lesiones que requieren un tratamiento de larga duración.

Si bien en el modelo de tuberculosis murina no hay necrosis ni cavitación de las lesiones y, por tanto, carece de la gran población extracelular existente en las lesiones humanas, sí que presenta una población intracelular equivalente y una población bacilar persistente, factores muy importantes en el diseño de pautas útiles para destruir los bacilos persistentes. De hecho, el modelo de tuberculosis murina ha tenido una gran importancia en el diseño de la pauta de trata-

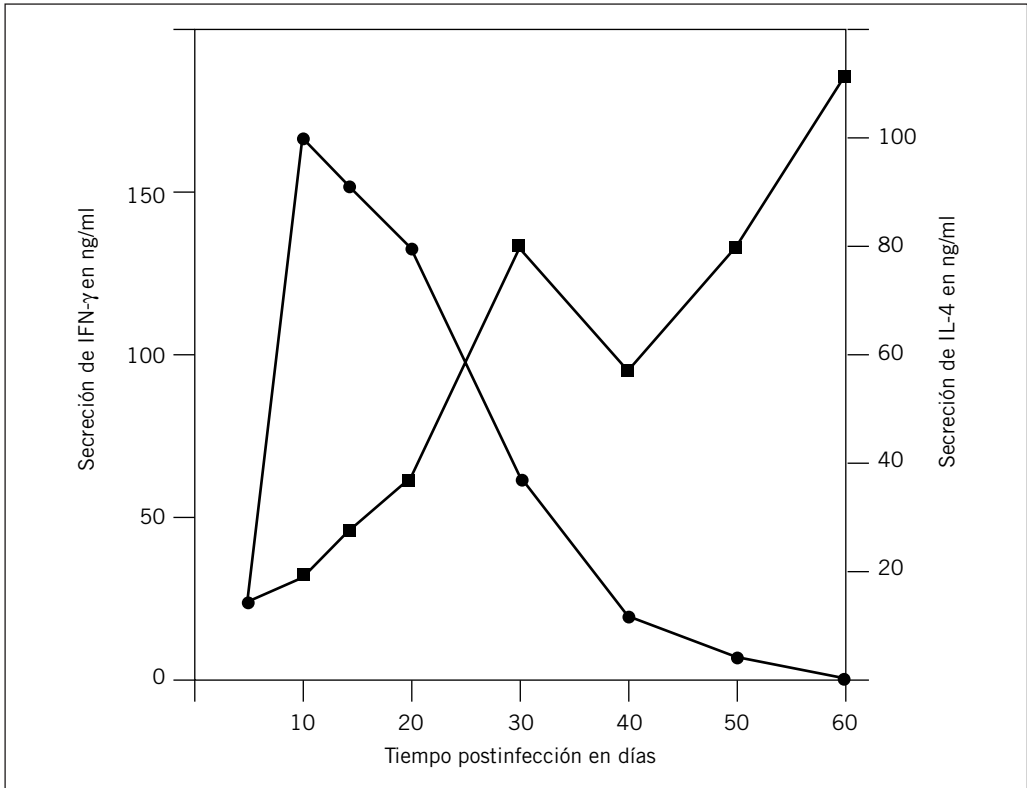


Fig. 6. Evolución de los linfocitos Th1 y Th2 en el modelo de tuberculosis murina. Producción de IL-4 e IFN- $\gamma$  en linfocitos T CD4 del bazo de ratones infectados por *M. tuberculosis*, cepa Erdman y estimulados posteriormente in vitro con antígenos secretados por los bacilos (Orme, 1993).

miento de corta duración actual (de 6 meses), realizándose la mayoría de experimentos en este período, induciendo principalmente la infección mediante inoculación intravenosa e iniciando el tratamiento a los 10 días posteriores al inóculo<sup>26</sup>. Entre estos experimentos dos deben considerarse claves en el desarrollo de esta terapia:

1. McCune et al<sup>27</sup> observaron que la curación de la tuberculosis murina experimental era posible después de 3 meses de tratamiento con isoniacida y pirazinamida. Estos resultados no habían sido conseguidos nunca previamente por ninguna de las combinaciones de fármacos existentes. Inicialmente estos resultados no fueron considerados importantes porque después de 3 meses sin tratamiento un tercio de los animales presentó una recaída, lo que demostraba la persistencia de bacilos en estado persistente en los animales aparentemente “negativos”.

2. El segundo experimento clave fue realizado por Grumbach y Rist<sup>28</sup> en 1967, cuando se empezó a disponer de la rifampicina. En este experimento, todos los animales tratados con la combinación isoniacida (25 mg/kg) más rifampicina (25 mg/kg) tuvieron cultivos negativos a los 4 meses de tratamiento. Esta combinación representaba una revolución, puesto que era posible conseguir la negativización de los cultivos en un 100 % de los animales, mientras que con la combinación estándar de isoniacida-estreptomicina sólo el 80 % de los animales conseguía la negativización de los cultivos en un período de 18 meses de tratamiento<sup>26</sup>.

A partir de entonces se realizaron numerosos experimentos en los que se consideraron diferentes combinaciones y dosis con rifampicina en las pautas de tratamiento; se concluyó que no se observaban recaídas en tratamientos con isonia-

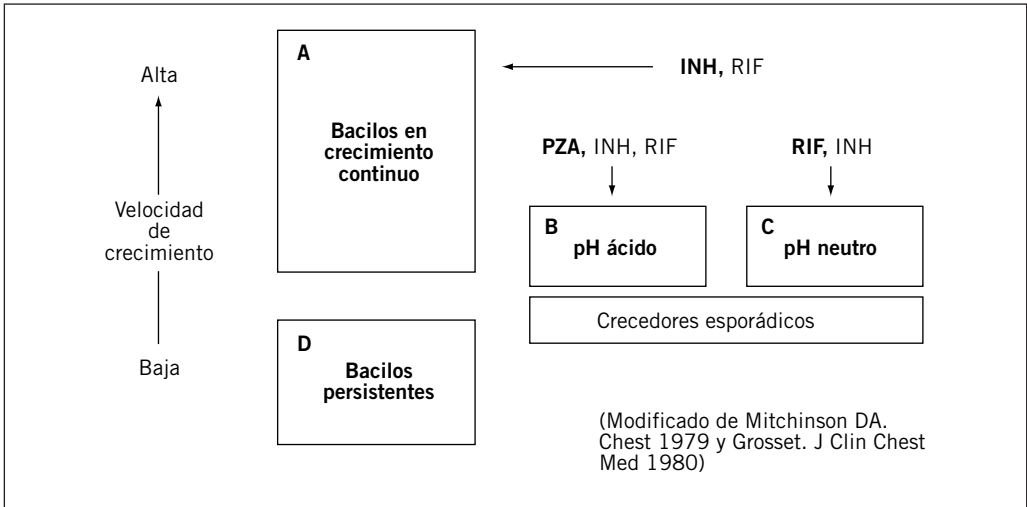


Fig. 7. Representación de las poblaciones bacilíferas presentes en las lesiones tuberculosas y los fármacos que son activos contra las mismas. En negrita el fármaco más activo en cada caso. INH: isoniazida; PZA: pirazinamida; RIF: rifampicina.

cida y rifampicina durante 9 meses, si bien no era necesario mantener la isoniazida durante los meses 6-9, ya que se observaba que la rifampicina era un fármaco muy eficaz en la destrucción de los bacilos persistentes, mientras que la isoniazida no lo era<sup>26</sup>.

Posteriormente se reconsideró el papel de la pirazinamida. Al principio se observó que aumentaba la eficacia de la combinación isoniazida-estreptomina<sup>29</sup>, aunque la adición de la pirazinamida después del tratamiento con isoniazida y rifampicina durante 3 meses no aumentaba la eficacia de esta combinación, incluso no incrementaba la eficacia del tratamiento con rifampicina sola<sup>30</sup>. Se puso así de manifiesto la baja actividad de la isoniazida sobre la población bacilífera persistente y que la actividad de la pirazinamida frente a esta población no era lo suficientemente aparente durante la fase de continuación del tratamiento.

Así pues, a partir de los experimentos en el modelo murino y también *in vitro* se considera que un enfermo con tuberculosis tiene lesiones en las cuales hay cuatro tipos de poblaciones bacilíferas<sup>26,31</sup> (fig. 7):

A. Población extracelular. Es la más importante, se divide activamente en las lesiones cavitarias consiguiendo a menudo concentraciones de  $10^7$  a  $10^9$  y contiene un número significativo de bacterias resistentes a cualquier antibiótico por separado.

B. Población intracelular localizada en el interior de los fagosomas acidificados de los macrófagos y extracelular situada en las paredes de la cavidad necrótica, donde persiste la inflamación y se mantiene un pH ácido. Se localiza un número reducido de bacilos ( $10^2$ - $10^5$  UFC/g).

C. Población extracelular a pH neutro situada en el interior de la cavidad necrótica, en el *caseum*, y la población intracelular de los fagosomas no acidificados. La magnitud de la concentración bacilar es similar a la B.

En las poblaciones B y C el crecimiento es lento y esporádico, y depende de cambios en el medio ambiente (p. ej., en la presión de oxígeno) que permite cortos accesos de crecimiento.

D. Población de bacilos persistentes, con muy baja actividad metabólica, y difíciles de eliminar mediante fármacos.

Las poblaciones B, C y D son las que obligan a prolongar el tratamiento<sup>26</sup>.

En cuanto a la profilaxis de la tuberculosis en pacientes infectados, a partir de los años ochenta se empezaron a realizar estudios en modelos experimentales para encontrar alternativas a la pauta de isoniazida, debido al peligro de lesión hepático y a la aparición de cepas resistentes. El grupo de Grosset diseñó un modelo experimental basado en el hecho que los individuos infectados tienen una población de *M. tuberculosis* relativamente limitada y que no se multiplica ac-



tivamente. Para mimetizar estas condiciones vacunaban a los animales con *M. bovis* BCG y un mes más tarde infectaban a los animales intravenosamente con una concentración reducida de *M. tuberculosis* ( $10^3$  UFC), iniciando el tratamiento a los 14 días posteriores<sup>32</sup>. En estos estudios se comprobó que la profilaxis de 2 meses con rifampicina más pirazinamida o de 3 meses con rifampicina sola era tan eficaz como la profilaxis con isoniacida durante 6 meses, basándose en la capacidad para esterilizar el bazo de los animales infectados. Es de destacar que no será hasta 10 años más tarde que ensayos clínicos en humanos comprobarán la eficacia de estas pautas<sup>33</sup>.

Hoy día, el modelo de tuberculosis murina se está utilizando ampliamente en la búsqueda de nuevos fármacos activos contra *M. tuberculosis*. Entre éstos se ha demostrado la eficacia de las nuevas rifamicinas (rifabutina o rifapentina) y las nuevas quinolonas (ofloxacino, esparfloxacino o levofloxacino). Por otro lado, se están empezando a ensayar combinaciones de antibióticos liposomados en ratones tuberculosos, que parecen tener una eficacia similar a la de los tratamientos tradicionales, con dosis más bajas y pautas intermitentes.

Conviene, pues, impulsar los modelos de tuberculosis experimental a fin de aliviar, lo antes posible, la pesada carga que representa la tuberculosis en el mundo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Young D. Genetics and tuberculosis. CHICHESTER: John Wiley & Sons, 1998.
2. SEPAR. Informe anual de l'area TIR, 1997.
3. De March P. La transmisión de la resistencia al *Mycobacterium tuberculosis* en los infectados por el VIH. La llamada tercera epidemia del VIH. Med Clin (BarC) 1994; 102: 98-100.
4. Grange JM. Immunophysiology and immunopathology of tuberculosis. En: Davies PDO, editor. Clinical tuberculosis. Londres: Chapman & Hall, 1998; 9: 129-152.
5. Yamamura Y, Ogawa Y, Maeda H, Yamamura Y. Prevention of tuberculous cavity formation by desensitization with tuberculin-active peptide. Am Rev Respir Dis 1974; 109: 594-601.
6. Canetti G. The tubercle bacillus in the pulmonary lesion of man. Nueva York: Springer Publishing Co., 1955.
7. Moulding T. Pathophysiology and immunology: clinical aspects. En: Schlossberg D, editor. Tuberculosis (3ª ed.). Nueva York: Springer-Verlag, 1994; 3: 41-50.
8. Converse PJ, Dannenberg AM Jr, Estep JE, Sugisaki K, Abe Y, Schofield BH, Pitt MLM. Cavitary tuberculosis produced in rabbits by aerosolized virulent tubercle bacilli. Infect Immun 1996; 64: 4.776-4.787.
9. Dannenberg AM Jr, Rook GAW. Pathogenesis on pulmonary tuberculosis: an interplay of tissue-damaging and macrophage-activating immune responses-dual mechanisms that control bacillary multiplication. En: Bloom BR, editor. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Washington DC: American Society for Microbiology, 1994; 27: 459-483.
10. Smith DW, Harding GE. Animal model of human disease: experimental airborne tuberculosis in the guinea pig. Am J Pathol 1977; 89: 273-277.
11. Lefford MJ. Diseases in mice and rats. En: Kubica GP, Wayne LG, editores. The mycobacteria: a source book. Nueva York: Marcel Dekker Inc., 1984; 38: 947-977.
12. Lurie MB. The correlation between the histological changes and the fate of living tubercle bacilli in the organs of tuberculous rabbits. J Exp Med 1932; 55: 31-58.
13. Lurie MB, Zappasodi P, Tickner C. On the nature of genetic resistance to tuberculosis in the light of the host-parasite relationships in natively resistant and susceptible rabbits. Am Rev Tuberc 1955; 72: 297-321.
14. Middlebrook G. An apparatus for airborne infection in mice. Proc Soc Exptl Biol Med 1952; 80: 105-110.
15. Pallen MJ. The inoculation of tissue specimens into guinea-pigs in suspected cases of mycobacterial infection-does it aid diagnosis and treatment? Tubercle 1987; 68: 51-57.
16. Mitchinson DA. The virulence of tubercle bacilli from patients with pulmonary tuberculosis in India and other countries. Bull Int Union Against Tuberculosis 1964; 35: 287-306.
17. Smith DW, Harding GE, Chan J, Edwards M, Hank J, Muller D et al. Potency of 10 BCG vaccines as evaluated by their influence on the bacillemic phase of experimental airborne tuberculosis in guinea-pigs. J Biol Stand 1979; 7: 179-197.
18. Mackaness GB. The immunology of antituberculous immunity. Am Rev Respir Dis 1968; 97: 337-344.
19. Orme IM, McMurray DN. The immune response to tuberculosis in animal models. En: Rom WN, Garay SM, editores. Tuberculosis. Boston: Little, Brown and Company, 1996; 22: 269-280.
20. North RJ. *Mycobacterium tuberculosis* is strikingly more virulent for mice when given via the respiratory than via the intravenous route. J Infect Dis 1995; 172: 1.550-1.553.
21. Cardona PJ, Cooper A, Luquín M, Ariza A, Filipo F, Orme IM et al. The intravenous model of murine tuberculosis is less pathogenic than the aerogenic model owing to a more rapid induction of systemic immunity. Scand J Immunol 1999; 49: 362-366.
22. Ho RS, Fok JS, Harding GE, Smith DW. Host-parasite relationships in experimental airborne tuberculosis. VII. Fate of *Mycobacterium tuberculosis* in primary lung lesions and in primary lesion-free lung

- tissue infected as a result of bacillemia. *J Infect Dis* 1978; 138: 237-241.
23. Smith DW, Wiegshaus EH. What animal models can teach us about the pathogenesis of tuberculosis in humans. *Rev Infect Dis* 1989; 11 (Supl 2): 385-393.
  24. Orme IM, Roberts AD, Griffin JP, Abrams JS. Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 1993b; 151: 518-525.
  25. Orme IM. Immunity to mycobacteria. Austin, Texas: RG. Landes Company, 1995.
  26. Grosset J. Bacteriologic basis for short-course chemotherapy for tuberculosis. *Clin Chest Med* 1980; 1: 231-242.
  27. McCune RM, Tompsett R, McDermott W. The fate of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse tissues as determined by the microbial enumeration technique. II. The conversion of tuberculous infection of the latent state by the administration of pyrazinamide and a companion drug. *J Exp Med* 1956; 104: 763-802.
  28. Grumbach F, Rist N. Activité antituberculeuse expérimentale de la rifampicine, dérivé de la rifamycine SV. *Rev Tuberc Pneum* 1967; 31: 749-762.
  29. Grosset J. The sterilizing value of rifampin and pyrazinamide in experimental short-course chemotherapy. *Bull Int Union Against Tuberculosis* 1978; 53: 5-12.
  30. Grosset J, Truffot Ch, Boval C. Sterilizing activity of isoniazid and pyrazinamide in combination with rifampicin in experimental tuberculosis of the mouse. *Thorax* 1979; 34: 708.
  31. Mitchinson DA. Basic mechanisms of chemotherapy. *Chest* 1979; 76; 6 (Supl): 771-781.
  32. Lecœur HF, Truffot-Pernot Ch, Grosset JH. Experimental short-course preventive therapy of tuberculosis with rifampin and pyrazinamide. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140: 1.189-1.193.
  33. Halsey NA, Coberly JS, Desormeaux J, Losikoff P, Atkinson J, Moulton LH et al. Randomised trial of isoniazid versus rifampicin and pyrazinamide for prevention of tuberculosis in HIV-1 infection. *Lancet* 1998; 351: 786-792.

## DISCUSIÓN

J.M. GATELL: Si no es un secreto de investigación, ¿cómo conseguís inducir la necrosis en vuestro modelo de tuberculosis? Por otro lado, para estudiar la respuesta serológica, ¿qué ventajas ofrece el modelo animal sobre el propio hombre?

P.J. CARDONA: En primer lugar, esta necrosis intragranulomatosa es el fruto de una larga y exhaustiva investigación bibliográfica y de una hipótesis generada por un grupo inglés en el que aseguraba que la presencia de necrosis intragranulomatosa se debía a un fenómeno de Shartzman o necrosis hemorrágica. El hecho de inocular localmente lipopolisacárido o TNF, en un tejido con altas concentraciones de TNF, como el granulomatoso generado por infección por *M. tuberculosis*, provocaría una necrosis hemorrágica. Inducimos la necrosis integral al inocular intranasalmente lipopolisacárido de *Escherichia coli*. Respondiendo a tu segunda pre-

gunta, en el animal existe la ventaja de poder reproducir diferentes situaciones como inducir infección, reinfección, reactivación y podemos tratar las lesiones, de manera que nos permite analizar qué tipo de respuesta se genera en cada caso y, por tanto, diferenciar entre infección y enfermedad. Incluso nos permite estudiar lo que ocurre después del tratamiento, la existencia de falsos positivos, falsos negativos, etc.

J.M. MIRÓ: Este modelo experimental de tuberculosis, ¿es un modelo de tuberculosis pulmonar o es un modelo diseminado con meningitis tuberculosa?

P.J. CARDONA: Es simplemente una tuberculosis pulmonar, aunque también se produce una diseminación renal, hepática, esplénica, etc., como sucede en la tuberculosis pulmonar humana. Pero no hay afectación de meninges.

---

# Modelos experimentales de osteomielitis

---

Manuel Gomis\*, José Barberán<sup>a</sup> y Javier Ariza<sup>b</sup>

Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital del Aire. Madrid. <sup>a</sup>Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Gómez Ulla. Madrid. Departamento de Medicina. Universidad Complutense. Madrid. <sup>b</sup>Servicio de Enfermedades Infecciosas. Ciudad Sanitaria de Bellvitge. L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona.

---

## RESUMEN

La osteomielitis humana todavía presenta importantes problemas de diagnóstico y tratamiento. La heterogeneidad de la enfermedad y el gran número de variables que influye sobre la misma (microorganismo causal, localización y extensión de la infección, edad del paciente, condición del huésped, grado de necrosis, entre otras) dificultan su estudio. Los ensayos clínicos con osteomielitis bien clasificadas y estratificadas son difíciles de llevar a cabo y generalmente sólo incluyen un reducido número de casos. Para controlar esta gran cantidad de factores, se han desarrollado modelos animales de confianza similares a la infección humana, y que permiten el estudio de la patogenia, el diagnóstico y el tratamiento de la osteomielitis. En este trabajo se realiza un breve resumen de los modelos animales históricos y actuales, y se describen con detalle los que nuestro grupo de trabajo ha creado con *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, así como los ensayos terapéuticos realizados en los mismos con cefotaxima, ceftazidima, piperacilina, imipenem/cilastatina, clindamicina y un factor estimulante de colonias de granulocitos.

*Palabras clave:*

Osteomielitis experimental. Osteomielitis crónica. Patología.

---

## OSTEOMYELITIS EXPERIMENTAL MODEL

Human osteomyelitis still presents important problems to evaluate and treatment. The heterogeneity of the disease and the high number of variables with influence (causal organism, site and extent of involvement, age of the patient, condition of the host, degree of necrosis, etc.) complicate the study. Clinical trials with osteomyelitis correctly classified and stratified are difficult to design and usually including a small number of patients. To control these multiple factors, it has been developed reliable animal models which approach to the human infection, and to allow the study of pathogenesis, diagnosis and treatment of osteomyelitis. In this article we have made a brief review of the historical and current models and we describe in detail the models created by our group with *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* and the therapeutic trials carried out with cefotaxime, ceftazidime, piperacillin, imipenem/cilastatin, clindamycin and a granulocyte colony-stimulating factor.

*Key words:*

Experimental osteomyelitis. Chronic osteomyelitis. Pathology.

---

## Introducción histórica

A pesar de los avances conseguidos en las últimas décadas en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, las tasas de curación que se obtienen en la osteomielitis, en particular en su forma crónica, continúan estando por debajo de

la media alcanzada en otros procesos, ya que no se logra esterilizar el hueso en más del 70 % de las ocasiones<sup>1,2</sup>. A esto contribuyen el retraso en su detección y la falta de unos regímenes terapéuticos óptimos. No obstante, se ha progresado notablemente en su tratamiento, lo que ha mejorado el pronóstico. Las nuevas técnicas de imagen

---

\*Correo electrónico: mgomis@iponet.es.

como la gammagrafía ósea, la tomografía computarizada o la resonancia magnética han aportado mayor precocidad, sensibilidad y especificidad en el diagnóstico, y el amplio arsenal terapéutico del que hoy día se dispone ha demostrado su eficacia en muchos casos<sup>3-5</sup>. Se han realizado numerosos ensayos clínicos, algunos de escaso rigor científico y muy pocos de tipo comparativo. A ello han contribuido la heterogeneidad de la enfermedad (etiología, patogenia, localización, forma evolutiva, etc.) y la variabilidad existente en otros muchos aspectos (criterios de inclusión y exclusión, definición de aguda o crónica, técnicas de diagnóstico, pautas de los antimicrobianos, indicaciones quirúrgicas y criterios de respuesta clínica y microbiana), que dificultan enormemente el diseño de los estudios por la incapacidad de conseguir grandes grupos homogéneos que permitan obtener conclusiones definitivas.

Los modelos de osteomielitis en el animal de experimentación permiten obtener una cantidad de individuos, con las distintas variables de la infección unificadas, lo suficientemente amplia como para intentar acercarse a la realidad de los problemas que plantea la infección del hueso.

La historia de la osteomielitis experimental en animales se inicia en el año 1884, cuando Rodet consigue desarrollar en el hueso de conejos, principalmente en las metafisis del fémur y de la tibia, lesiones similares a las de la infección ósea humana, tras inyectarles por vía intravenosa *micrococcus*, aunque en el experimento murieron prematuramente bastantes animales por sepsis<sup>6</sup>. Diez años más tarde, Lexer repite el experimento usando pequeñas cantidades atenuadas de *Staphylococcus* spp. para evitar la muerte de los conejos en los primeros días y la aparición de artritis, obteniendo cambios patológicos en el hueso, pero sin lograr una infección progresiva<sup>7</sup>. Posteriormente, hubo una serie de intentos fallidos llevados a cabo por Starr en 1922, Haldeman en 1934 y Thompson y Dubos en 1938, quienes inoculando *Staphylococcus aureus* por vía intravenosa o de forma local en el hueso de conejos, sólo observaron lesiones supurativas en la zona de la administración del microorganismo<sup>8-10</sup>.

En 1941, Scheman et al, en otro modelo en conejos, son los primeros autores que consiguen una osteomielitis crónica progresiva en el animal de experimentación. Para ello, previamente a la inoculación de *S. aureus* por vía intravenosa o de forma directa en el hueso, introdujeron 0,3-0,4 ml de una sustancia esclerosante denominada *morruate sodium* al 5 %, con el fin de crear una trombosis vascular. El objetivo se alcanzó en la mayoría de los animales que recibieron la carga

bacteriana localmente y sobrevivieron más de 2-4 semanas. La administración por separado de la sustancia esclerosante y de *S. aureus* no fue suficiente para inducir la infección. Un porcentaje muy elevado de animales a los que se les inyectó el inóculo por vía intravenosa murieron en pocos días con abscesos hepáticos, esplénicos y renales, y ocasionalmente óseos<sup>11</sup>. Este mismo modelo fue reproducido en 1966 por Stevens<sup>12</sup>, pero ni este autor ni los creadores del mismo llegaron a tener conciencia de la trascendencia que su invento iba a tener en años posteriores.

La valoración adecuada y el desarrollo definitivo llegó con la experiencia de Norden y Kennedy en 1970, quienes perfeccionaron el modelo de Scheman estableciendo una osteomielitis crónica de manifestaciones histopatológicas y radiográficas similares a la humana. El trabajo fue realizado en conejos blancos Nueva Zelanda, a los que a través de una aguja insertada de forma percutánea en la cara lateral de la metafisis de la tibia, hasta alcanzar la cavidad medular, se les inyectaba 0,1 ml de *morruate sodium* al 5 %, seguido de la misma cantidad de una suspensión bacteriana de *S. aureus* resistente a la penicilina y de suero fisiológico para asegurar la entrada de los anteriores compuestos dentro de la médula. Los estudios histopatológicos demostraron lesiones características de osteomielitis con trayectos fistulosos y exudado purulento, y recuperaron el microorganismo en más del 90 % de los casos con un recuento medio de 10<sup>5</sup> unidades formadoras de colonias (UFC)/ml. Así mismo, establecieron grupos de animales con concentraciones variables del inóculo, demostrando una relación entre la dosis y el efecto. En los hemocultivos realizados, la frecuencia de las bacteriemias disminuía conforme se distanciaban en el tiempo de la inoculación. Los estudios radiográficos fueron aparentes entre las 2 y las 3 semanas después de la inyección de la carga bacteriana. El mismo procedimiento fue realizado con *Proteus mirabilis* alcanzando el éxito en un porcentaje más reducido de animales<sup>13</sup>.

Andriole et al desarrollaron otro modelo de osteomielitis estafilocócica similar al de Norden y Kennedy, con la diferencia de que la inoculación se hacía mediante la apertura de un agujero en la cortical de la tibia con la ayuda de un microtalladro. Además, en una serie de animales introdujeron una aguja de acero en el canal medular y en otra produjeron una fractura. En la primera, la infección se observó en todos los casos, y sólo en el 88 % de la segunda<sup>14</sup>.

La participación cada vez más frecuente de *Pseudomonas aeruginosa* en la osteomielitis hu-

mana ha llevado a crear modelos experimentales con este microorganismo. Hubo un primer intento por parte de Van Wingerden et al<sup>15</sup>, pero fueron Norden y Keleti los que lo establecieron definitivamente en 1980 con la misma técnica anteriormente descrita. La infección fue más leve, menos destructiva y con menor formación de involucro y extensión fuera del hueso que con *S. aureus*. El microorganismo se recuperó en el 90 % de los animales<sup>16</sup>. Este modelo fue modificado por Mader y Wilson en 1986: el *morrhuate sodium* se introdujo 2 días antes de la inoculación y previamente al momento de hacer la misma, y se elevó la concentración de *P. aeruginosa*, con lo que la consecución de la osteomielitis fue más rápida y progresiva<sup>17</sup>.

Johansson et al aprovecharon las anteriores técnicas para desarrollar un modelo con *Bacteroides fragilis*. En él se utilizó una esponja de alcohol de polivinilo impregnada con el microorganismo, que se colocó en la cavidad medular a través de un agujero realizado con un microtaladro, donde con anterioridad se había colocado *morrhuate sodium*<sup>18</sup>.

La utilización de ratas como animal de experimentación en la osteomielitis ha sido posterior. El primer modelo es el descrito por Zak et al en ratas Wistar en 1982. Utilizaron *S. aureus* y siguieron las directrices de Norden y Kennedy con la diferencia exclusiva del empleo de un microtaladro para hacer la inoculación y el cierre del mismo con cera ósea. A los 14 días de inyectar la suspensión bacteriana fueron evidentes los microabscesos y los fragmentos de hueso necrosado rodeados de una infiltración de neutrófilos, aunque era rara la presencia de sequestros y neoformación ósea. En las ratas sacrificadas después del primer mes de la inoculación se comprobó la producción de una osteomielitis crónica similar a la humana con sequestros, formación de hueso reactivo y un infiltrado crónico con macrófagos<sup>19</sup>. Rising et al realizaron un modelo parecido en ratas Sprague-Dawley, pero haciendo la inoculación con una aguja percutánea<sup>20</sup>. En un segundo trabajo emplearon como sustancia esclerosante ácido araquidónico y demostraron que era tan eficaz como el *morrhate sodium* para el desarrollo de la osteomielitis con la ventaja de usar dosis menores. Su mecanismo de acción es similar, aunque es probable que las prostaglandinas sintetizadas a partir de él sean las responsables de la respuesta inflamatoria y de la reabsorción ósea<sup>21</sup>.

En los últimos años han aparecido algunos trabajos en los que se ha logrado la osteomielitis sin utilizar ninguna sustancia esclerosante, cuando parecía necesaria en anteriores estudios. Así lo

han demostrado Nelson et al en un modelo en ratas con *P. aeruginosa*, donde indujeron la infección en el 90-95 % de los animales<sup>22</sup> y más recientemente Gisby et al en otro modelo con *S. aureus*<sup>23</sup>.

Otros animales como perros<sup>24,25</sup>, cobayas<sup>26</sup> y pollos<sup>27</sup> también han servido de modelos para esta infección.

## Descripción del modelo

Nuestro grupo de trabajo, ante el incremento de las osteomielitis por bacilos gramnegativos como consecuencia de los cambios epidemiológicos ocurridos por diversos factores en los últimos tiempos (empleo de técnicas quirúrgicas más agresivas, la adicción a drogas intravenosas, la hemodiálisis las inmunodeficiencias, los traumatismos asociados a accidentes de tráfico, etc.), desarrolló un modelo de osteomielitis en ratas Wistar con varias bacterias de esta característica tintorial, basado en las experiencias previas de Zak et al. Posteriormente creamos otro con *S. aureus*, siguiendo idénticos procedimientos. Una vez que estos modelos fueron validados, procedimos a la valoración de distintos antimicrobianos.

## Creación del modelo con bacilos gramnegativos

### Material y métodos

**Microorganismos.** Se escogió una cepa de *Escherichia coli* y otra de *P. aeruginosa*, ambas de procedencia clínica. El microorganismo se mantuvo en incubación en agar Müller-Hinton a 35 °C la noche anterior al día de la inoculación. El inóculo se preparó el mismo día de su utilización, comparando la densidad óptica con la escala de McFarland, para obtener una concentración bacteriana de 10<sup>7</sup> UFC/0,05 ml de *E. coli* y 10<sup>8</sup> UFC/0,05 ml de *P. aeruginosa*.

**Animales.** Se emplearon dos lotes de 30 ratas Wistar homogéneas en género, edad y peso, que fueron divididos en cuatro sublotos de 7-8 animales. Un lote se inoculó con *E. coli* y otro con *P. aeruginosa*.

**Preanestesia y anestesia.** Treinta minutos antes de la anestesia se administraron a los animales 0,6-1 ml (3-5 mg) de clorpromazina por vía intramuscular.

La anestesia se realizó por vía intraperitoneal con tiopental sódico, a la dosis de 50 mg/kg de peso. Para su administración se preparó una di-

lución 1/60 de un vial de 1 ml, conteniendo 1 g de tiopental sódico con agua destilada. La dilución contenía 16,6 mg/ml. Cuando esta anestesia no fue suficiente, se suministró éter etílico por inhalación mediante una campana de plástico, conteniendo algodones empapados en la sustancia, aproximándola a la cabeza del animal para facilitar su respiración.

**Técnica de inoculación.** La pata trasera izquierda se afeitó y se limpió con alcohol de 70°. A continuación se colocó el animal en un campo quirúrgico estéril. Se practicó una incisión longitudinal medial, en bloque, en el tercio superior de la tibia (tuberosidad), hasta la cresta tibial, rechazando planos musculares, aponeurosis y periostio. Con un microtaladro de dentista, que contenía una broca de 1 mm, se practicó un agujero en la cara interna metafisaria hasta alcanzar la cavidad medular. En él se insertó una aguja de 0,8 mm, a través de la cual se inyectaron 0,05 ml de sulfato de bario estéril diluido al 10% en suero fisiológico (que actúa como sustancia esclerosante), seguido de 0,05 ml de la suspensión bacteriana y de 0,05 ml de suero fisiológico para asegurar la entrada de los anteriores elementos. Después, la aguja se retiró, el agujero fue obturado con cera ósea estéril y la herida cerrada en un solo plano con seda. Acto seguido el animal fue devuelto a su jaula.

**Obtención y procesamiento de las muestras.** A los 7, 14, 28 y 56 días tras la inoculación, se sacrificaron dos sublotos de ratas, cada uno correspondiente a un microorganismo, utilizando una sobredosis de tiopental sódico intraperitoneal. Se desarticularon y aislaron las tibias inoculadas, y se lavaron externamente con alcohol de 70°. Un tercio de las huesos se introdujo en recipientes individuales con formaldehído al 10% para su procesamiento histopatológico. El resto del material, tras ser triturado en un mortero estéril de acero inoxidable, se colocó también en recipientes individuales con 5 ml de caldo de Müller-Hinton a 4 °C, para su transporte y posterior estudio microbiano.

**Procedimiento histopatológico.** Las muestras obtenidas, previamente fijadas en formaldehído al 10%, fueron decalcificadas con ácido nítrico al 7%. Posteriormente se procesaron según el método habitual de inclusión en parafina. Se realizaron las siguientes tinciones: hematoxilina-eosina, reticulina de Wilder, PAS y tricrómico de Masson.

**Procedimiento microbiano.** Las tibias trituradas se incubaron en estufa de cultivo a 35 °C duran-

te 24 h. A continuación se hicieron diluciones seriadas en suero fisiológico. De cada una de ellas se tomaron 0,025 ml con micropipeta y se sembraron en placas de Petri con agar Müller-Hinton para *P. aeruginosa* y agar MacConkey para *E. coli*, incubándose 24 h a 37 °C en estufa de cultivo. Finalmente se procedió a la lectura de las placas e identificación del microorganismo por técnicas habituales.

**Lotes accesorios.** En 8 ratas accesorias no incluidas en los lotes anteriores, se provocaron lesiones por el taladro, y en otras ocho se hizo lo mismo inyectándose a continuación la sustancia esclerosante (sulfato de bario estéril al 10% en suero fisiológico). Las ratas fueron sacrificadas en grupos de dos para su estudio histopatológico, a las 24 h, y a los 3, 7 y 14 días.

### Resultados

**Mortalidad.** Seis ratas (20%) murieron en las 48 h que siguieron a la inoculación de *P. aeruginosa*. Las 24 ratas que sobrevivieron quedaron divididas en cuatro sublotos de 6 animales.

Cinco ratas (16,6%) murieron en las 72 h posteriores a la inoculación de *E. coli*. Las 25 restantes quedaron divididas en tres sublotos de seis y uno de siete.

**Resultados microbianos.** Éstos fueron homogéneos, recuperándose el agente causal en todos los casos, con discretos incrementos en el número de UFC/g (tabla I).

**Resultados histopatológicos.** El estudio histopatológico demostró la aparición de lesiones osteomielíticas evidentes a partir del día 14 en el caso de *P. aeruginosa* e incluso antes con *E. coli*. Había necrosis óseas rodeadas e infiltradas por polimorfonucleares, células plasmáticas y más hacia la periferia, sobre todo a partir del día 28, se observaron osteocitos y aposición de hueso, tendiendo hacia la formación de lesión granulomatosa de cuerpo extraño. Macroscópicamente eran evidentes la osteólisis y las deformaciones (tablas II y III).

En ocho de las ratas no incluidas en los anteriores lotes se estudiaron los efectos provocados por la broca y el taladro, encontrándose lesiones localizadas, sin sequestratos y con escasa reacción leucocitaria y fibrosa, y sin reactivación osteoblástica marcada. En otras 8 ratas tampoco incluidas, a las que se inyectó sulfato de bario, se encontraron lesiones esclerosas medulares y destructivas trabeculares sin reacción osteoblástica ni fibrosa.

TABLA I  
RESULTADOS MICROBIANOS DEL MODELO CON BACILOS GRAMNEGATIVOS

<i>Microorganismo</i>	<i>Día del sacrificio</i>	<i>Número de muestras</i>	<i>Media Log UFC/g ± desviación típica</i>
<i>P. aeruginosa</i>	7	4	7,559 ± 0,129
	14	4	7,911 ± 0,094
	28	4	8,022 ± 0,043
	56	4	8,201 ± 0,063
<i>E. coli</i>	7	4	7,570 ± 0,086
	14	4	7,872 ± 0,066
	28	4	7,967 ± 0,057
	56	4	8,269 ± 0,056

TABLA II  
RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS CON *P. AERUGINOSA*

<i>Día de sacrificio</i>	<i>Macroscopia</i>	<i>Microscopia</i>
7	Sin alteraciones	Sin alteraciones
14	Lesión osteolítica Deformación ósea	Necrosis supurativa ósea
28	Lesión osteolítica Deformación ósea	Necrosis supurativa ósea con secuestros óseos
56	Lesión esclerosa Deformación ósea	Lesión crónica esclerosa Lesión granulomatosa de cuerpo extraño

TABLA III  
RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS CON *E. COLI*

<i>Día de sacrificio</i>	<i>Macroscopia</i>	<i>Microscopia</i>
7	Lesión osteolítica Deformación ósea	Necrosis supurativa ósea
14	Lesión osteolítica Deformación ósea	Necrosis supurativa ósea
28	Lesión osteolítica Deformación ósea	Necrosis supurativa ósea con secuestros óseos
56	Lesión osteolítica Deformación ósea	Lesión crónica esclerosa

### Creación del modelo con *S. aureus*

#### *Material y métodos*

*Microorganismos.* Se escogió una cepa de *S. aureus* sensible a la metilicina, procedente de un aislado clínico de un paciente con osteomielitis. El inóculo, que contenía una concentración de  $3 \times 10^8$  UFC/ml, se preparó de igual forma que el modelo anterior.

*Animales.* Se emplearon 50 ratas Wistar homogéneas en cuanto a género, edad y peso, que fueron divididos en seis grupos. Los cuatro primeros de 10 animales y los otros dos de cinco.

*Preanestesia y anestesia.* Igual al modelo con bacilos gramnegativos.

*Técnica de inoculación.* Igual al modelo con bacilos gramnegativos. Los animales del grupo 6 no

recibieron la suspensión bacteriana, ni los del grupo 5, sulfato de bario.

*Obtención y procesamiento de las muestras.* Los cuatro primeros grupos se sacrificaron a los 7, 14, 28 y 56 días, respectivamente, tras la inoculación y el los grupos 5 y 6 a las 2 semanas. La obtención y procesamiento de las muestras fue igual al modelo anterior con *P. aeruginosa*. La mitad de los huesos de los cuatro primeros grupos y todos los de grupo 6 fueron para estudio histopatológico. El resto del material lo fue para el microbiano.

*Procedimiento histopatológico y microbiano.* Igual al modelo con *P. aeruginosa*.

*Procedimiento estadístico.* Los datos obtenidos se han tratado con el programa SPSS para Win-

TABLA IV  
RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS  
DEL MODELO CON *S. AUREUS*

	UFC/ml	UFC/g de hueso
Grupo 1		
Tibia 1	$3 \times 10^3$	$4,7 \times 10^3$
Tibia 2	$1 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$
Tibia 3	$4,2 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$
Tibia 4	$7,5 \times 10^5$	$1,05 \times 10^6$
Tibia 5	$12,8 \times 10^6$	$1,5 \times 10^7$
Grupo 2		
Tibia 1	$16,1 \times 10^4$	$1,9 \times 10^5$
Tibia 2	$3,6 \times 10^2$	$5,2 \times 10^2$
Tibia 3	$4,8 \times 10^2$	$7 \times 10^2$
Tibia 4	$3 \times 10^4$	$6,5 \times 10^4$
Tibia 5	$7,75 \times 10^4$	$1,05 \times 10^5$
Grupo 3		
Tibia 1	$2,7 \times 10^3$	$3,3 \times 10^3$
Tibia 2	$6,8 \times 10^4$	$8,5 \times 10^4$
Tibia 3	$3,3 \times 10^4$	$4,2 \times 10^4$
Tibia 4	—	—
Tibia 5	$9,9 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$
Grupo 4		
Tibia 1	$5 \times 10^4$	$7 \times 10^4$
Tibia 2	$3 \times 10^3$	$3,6 \times 10^3$
Tibia 3	$9,3 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$
Tibia 4	$1,9 \times 10^4$	$3,1 \times 10^4$
Tibia 5	$3,7 \times 10^4$	$5 \times 10^4$
Grupo 5		
Tibia 1	$7,2 \times 10^4$	$8,4 \times 10^4$
Tibia 2	$8 \times 10^4$	$9 \times 10^4$
Tibia 3	$6,6 \times 10^2$	$9 \times 10^2$
Tibia 4	$3,9 \times 10^2$	$4,5 \times 10^2$
Tibia 5	$5,4 \times 10^3$	$6,3 \times 10^3$

dows. En la descripción estadística se utilizó la mediana, moda, máximo, mínimo y rango, y en la comparación de grupos el test de la U de Mann-Whitney. Se consideró significativo un valor de  $p < 0,05$ .

*Resultados*

*Resultados clínicos.* En los días siguientes a la inoculación las ratas tuvieron un comportamiento normal. En 12 se observó un aumento de la temperatura corporal al tacto que más tarde desapareció y en 14 había signos inflamatorios locales y abscesos de partes blandas en la extremidad manipulada.

*Resultados histológicos.* En las tibias de los cuatro primeros grupos existían lesiones líticas con los típicos *nidus* formados por una zona central de necrosis, donde en ocasiones se veían cocos gram-positivos, rodeada por capas de un infiltrado de células inflamatorias (polimorfonucleares, linfocitos y células plasmáticas) y más periféricamente de una reacción fibrohistiocitaria. Las tibias del grupo 6 sólo presentaban lesiones fibrosas semejantes a un granuloma de cuerpo extraño.

*Resultados microbianos.* En todas las tibias de los diferentes grupos que recibieron inóculo bacteriano, excepto una del grupo 3, se recuperaron estafilococos. En la tabla IV se reflejan las cifras en UFC/ml y en UFC/g de hueso, en la tabla V la estadística descriptiva y en la tabla VI los resultados de la comparación entre los grupos aplicando el test de la U de Mann-Whitney.

**Modelo con *E. coli*. Tratamiento con cefotaxima<sup>28</sup>**

*Material y métodos*

*Microorganismos.* Se empleó una cepa de *E. coli* con la que se llevó a cabo una suspensión bacteriana de  $10^7$  UFC/0,05 ml. La concentración mínima inhibitoria para cefotaxima fue de  $0,25 \mu\text{g/ml}$ . En la preparación del inóculo se siguieron las mismas normas que en la creación del modelo.

*Animales.* Se utilizaron 48 ratas Wistar homogéneas en cuanto a género, edad y peso, con las que se establecieron cuatro grupos:

*CNT-1:* grupo control sin tratamiento. Las ratas se sacrificaron 56 días después de la inoculación. Contenía 11 ratas.



TABLA V  
ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DEL MODELO CON *S. AUREUS*

	<i>Mediana</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Moda</i>	<i>Máximo</i>	<i>Rango</i>
Grupo 1					
UFC/ml	420.000	3.000	3.000	12.800.000	12.797.000
UFC/g	460.000	4.700	4.700	15.000.000	14.995.300
Grupo 2					
UFC/ml	30.000	360	360	161.000	160.640
UFC/g	65.000	520	520	190.000	189.480
Grupo 3					
UFC/ml	50.500	2.700	2.700	99.000	96.300
UFC/g	63.500	3.300	3.300	160.000	156.700
Grupo 4					
UFC/ml	37.000	3.000	3.000	93.000	90.000
UFC/g	50.000	3.600	3.600	120.000	116.400
Grupo 5					
UFC/ml	5.400	390	390	80.000	79.610
UFC/g	84.000	450	450	90.000	89.550

TABLA VI  
RESULTADOS DE LA COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS EN EL MODELO  
CON *S. AUREUS*. TEST DE LA U DE MANN-WHITNEY

	<i>Grupo 2</i>	<i>Grupo 3</i>	<i>Grupo 4</i>	<i>Grupo 5</i>
Grupo 1	p = 0,0758	p = 0,0864	p = 0,0937	
Grupo 2		p = 0,6242	p = 0,7540	p = 0,9168
Grupo 3			p = 0,8065	

*CTX-1*: grupo de tratamiento corto (14 días), en el que la antibioterapia se inició 14 días después de la inoculación. Las ratas se sacrificaron 28 después de finalizar el tratamiento (56 días después de la inoculación). Contenía 13 ratas.

*CNT-2*: grupo control sin tratamiento. Las ratas se sacrificaron 70 días después de la inoculación. Contenía 11 ratas.

*CTX-2*: grupo de tratamiento largo (28 días). El tratamiento se inició 14 días después de la inoculación. Las ratas se sacrificaron 28 días después de acabar la antibioterapia (70 días después de la inoculación). Contenía 13 ratas.

*Antibioterapia*. La dosis de cefotaxima fue de 100 mg/12 h administrada por vía subcutánea. Se calculó a partir de una dosis estándar en osteomielitis humana del adulto, establecida en mg/kg de peso/día. Esta cantidad se corrigió multiplicando por un factor 6 (corrección peso/superficie del animal), conociendo la cantidad a administrar en mg/kg de peso/día/rata.

*Preanestesia y anestesia*. Igual que en la creación del modelo.

*Técnica de inoculación*. Igual que en la creación del modelo.

*Obtención y procesamiento de las muestras*. Igual que en la creación del modelo: 5 tibias de los grupos de control y seis de los de tratamiento se destinaron para estudio histopatológico. Para el procesamiento microbiano se emplearon 6 tibias de los grupos de control y siete de los de tratamiento.

*Procedimiento histopatológico y microbiano*. Igual que en la creación del modelo.

*Valoración estadística*. Las diferencias entre las medias se compararon por medio de la t de Student.

*Resultados*

*Mortalidad*. Cinco ratas (10 %) murieron antes de la fecha del inicio del tratamiento, dentro de las

TABLA VII  
 RESULTADOS MICROBIANOS (UFC/g) DEL MODELO CON *E. COLI*.  
 TRATAMIENTO CON CEFOTAXIMA

Rata	CNT-1	CTX-1	CNT-2	CTX-2
1	$6,47 \times 10^6$	$4 \times 10^4$	$6,24 \times 10^7$	$0,12 \times 10^2$
2	$8,83 \times 10^5$	$1,52 \times 10^5$	$10^8$	0
3	$2,40 \times 10^7$	$1,6 \times 10^5$	$7,75 \times 10^7$	0
4	$5,47 \times 10^6$	0	$6 \times 10^7$	0
5	—	$1,8 \times 10^5$	$2 \times 10^8$	0
6	—	$2,4 \times 10^5$	—	0
7	—	0	—	0
m <sub>x</sub>	6,716	3,6604	7,9527	0,154
δ	0,5145	2,3260	0,3408	0,3776
Sm	0,2970	0,9496	0,1740	0,1541

CNT-1: grupo control sin tratamiento; CTX-1: grupo de tratamiento corto (14 días); CNT-2: grupo control sin tratamiento; CTX-2: grupo de tratamiento largo (28 días).

Diferencias entre las medias: CNT-1 y CTX-1:  $p > 0,05$ ; CNT-2 y CTX-2:  $p < 0,05$ ; CTX-1 y CTX-2:  $p < 0,05$ .

72 h que siguieron a la inoculación. En 2 ratas se atribuyó a efectos de la anestesia y en tres a sepsis por *E. coli*.

### Resultados microbiológicos

#### 1. Tratamiento corto

En los animales tratados durante 14 días se obtuvo la esterilización del hueso en 2 de 7 (28,5 %), observándose en el resto pequeñas reducciones en el número de UFC/g, con respecto al grupo control CNT-1. Las diferencias entre las medias de CNT-1 y CTX-1 no fueron significativas (tabla VII).

#### 2. Tratamiento largo

En los animales tratados 28 días se obtuvo la esterilización en 6 de 7 casos (85,7 %). El único recuento bacteriano positivo fue significativamente menor que los observados en el grupo control. La diferencia de las medias entre los grupos CNT-2 y CTX-2 fue inferior a 0,05 (tabla VII).

#### 3. Grupos control

El microorganismo se recuperó en todas las muestras óseas.

#### 4. Estudio de la concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria (CMI) del microorganismo ensayado para cefotaxima previa al tratamiento fue de 0,25 µg/ml. Las CMI de los microorganismos aislados en las tibias de los animales tratados y en los controles oscilaron entre 0,25 y 1 µg/ml.

### Resultados histopatológicos

#### 1. Tratamiento corto

Todos los animales (n = 6) presentaron necrosis focal en la metafisis, con destrucción ósea y acúmulos de hueso compacto neoformado. La celularidad que rodeaba el área de necrosis correspondía a osteocitos, células plasmáticas y fibroblastos en neoformación capilar intensa. En la necrosis ósea existía gran infiltración de polimorfonucleares.

#### 2. Tratamiento largo

El 83 % de los animales (n = 5) no presentaron alteraciones microscópicas de actividad osteomielítica. En un animal, la lesión estaba constituida por una reacción inflamatoria crónica, con gran predominio de fibroblastos y neoformación ósea.

#### 3. Grupos de control

En todos los animales se observó lesión lítica macroscópica. Con microscopia óptica se objetivó necrosis destructiva supurada con secuestros óseos.

### Efectos adversos

Durante el tratamiento con cefotaxima no se observaron efectos secundarios.

### Modelo con *P. aeruginosa* y otros antibióticos

Siguiendo la misma metodología previamente explicada, durante estos años hemos investigado

el comportamiento de ceftazidima, piperacilina e imipenem/cilastatina frente a *P. aeruginosa*.

#### Ceftazidima<sup>29</sup>

Este antibiótico se administró a la dosis de 100 mg/12 h por vía subcutánea. Para el modelo se utilizó un cepa de procedencia clínica, con una CMI de 2 µg/ml. Se establecieron tres grupos de 15 ratas cada uno: uno de control al que no se administró el antibiótico (se sacrificó 20 días después de la inoculación) y dos de tratamiento, uno corto de 14 días (inicio a los 14 días de la inoculación y sacrificio 28 después de finalizar la administración del antibiótico) y otro largo de 28 (inicio a los 14 días de la inoculación y sacrificio 28 después de finalizar la administración del antibiótico). En los animales tratados 14 días se obtuvo la esterilización en el 43 % (3 de 7), y en los que recibieron ceftazidima durante 28 días en el 57 % (4 de 7). En ambos casos, cuando la negativización de los cultivos no fue posible, se observaron pequeñas reducciones de UFC/g con respecto al grupo control. No hubo diferencias significativas entre los dos grupos de tratamiento, pero sí que se hallaron con respecto al de control ( $p < 0,05$ ). En todos los animales de los grupos de control se recuperaron los microorganismos. La CMI inicial de 2 µg/ml, se mantuvo en los microorganismos que se aislaron en los huesos. En las ratas tratadas 14 días se evidenciaron necrosis focal con destrucción ósea y acumulaciones de hueso compacto neoformado. La celularidad que rodeaba el área de necrosis correspondía a osteocitos, células plasmáticas y fibroblastos con neoformación capilar intensa. En las del grupo de tratamiento prolongado, en 5 de 7 casos no se observaron lesiones microscópicas ni macroscópicas de actividad osteomielítica. En las dos restantes se encontró una reacción inflamatoria crónica con predominio de fibroblastos y neoformación ósea. En todos los animales del grupo de control se observó una lesión osteolítica macroscópica, y en la microscopia óptica necrosis destructiva supurada con secuestros óseos. No se apreciaron efectos adversos.

#### Piperacilina<sup>30</sup>

Se administró 2 semanas después de la inoculación, por vía subcutánea a razón de 126 mg/kg/día, repartida en tres dosis, durante 28 días. Se establecieron dos grupos: uno de control (10 ratas) y otro de tratamiento (15 ratas) que se sacrificaron 70 días después de la inocu-

lación. En ningún animal se logró esterilizar el hueso, pero sí se objetivó una reducción significativa de las UFC/g de hueso respecto al grupo control ( $p < 0,001$ ). En las tibias de las ratas tratadas no se observaron signos macroscópicos ni microscópicos de osteomielitis activa.

#### Imipenem/cilastatina<sup>31</sup>

El antibiótico se administró a la dosis de 40 mg/kg/8 h por vía subcutánea. La CMI de la cepa de *P. aeruginosa* seleccionada para imipenem/cilastatina fue de 1 µg/ml. Se crearon dos grupos de control de 8 ratas cada uno, con sacrificios a los 28 y 40 días, respectivamente, después de la inoculación, y otros dos de tratamiento durante 10 días, que se inició a los 15 de la inoculación. El primer grupo de tratamiento estaba formado por 10 ratas, sacrificadas al día siguiente de finalizar la administración del antibiótico. El segundo grupo de tratamiento estaba compuesto por 14 ratas, cuyo sacrificio se demoró hasta haber pasado 15 días después de terminar el tratamiento. No se consiguió la esterilización en ninguna rata, excepto en una del segundo grupo de tratamiento, pero se logró una reducción significativa de las UFC/g con respecto a los grupos de control. Las CMI de los microorganismos que se recuperaron en los huesos se mantuvieron iguales a las iniciales.

#### Modelo con *S. aureus* y dosis terapéuticas y subterapéuticas de clindamicina<sup>32</sup>

Se empleó una cepa de *S. aureus*, sensible a la meticilina, procedente de un aislamiento clínico. Se establecieron tres grupos, uno de control sin tratamiento (6 ratas) y otros dos con clindamicina de 7 y 8 ratas. El antibiótico fue administrado a la razón de 70 y 90 mg/kg/día, respectivamente, en tres dosis, durante 28 días, por vía subcutánea. En los dos grupos de tratamiento hubo una disminución significativa de las UFC/ml respecto al control, pero no se detectaron diferencias entre los mismos.

#### Modelo con *S. aureus* y factor estimulante de colonias de granulocitos más dosis subterapéuticas de clindamicina<sup>33</sup>

Se crearon tres grupos: a) control con 27 ratas sin tratamiento; b) tratadas con clindamicina (35 mg/kg b.i.d., subcutánea), y c) tratadas con clindamicina (35 mg/kg b.i.d., subcutánea) más factor estimulante de colonias de granulocitos (25 µg/kg b.i.d., subcutáneo). El tratamiento se

inició 14 días después de la inoculación y se prolongó durante 28 días. El sacrificio se efectuó a las 2 semanas de terminar la terapia. Con el factor estimulante de colonias asociado a clindamicina se produjo una reducción de las UFC/ml cuatro veces mayor que sin él, aunque no fue suficiente para alcanzar una significación estadística.

## DISCUSIÓN

La elección de la rata Wistar en vez del conejo para desarrollar nuestro modelo se debió a que este animal se maneja con mayor facilidad, resulta más económico y no presenta de forma tan manifiesta los efectos secundarios (diarreas inespecíficas o idiopáticas o por colitis pseudomembranosa) del empleo de antimicrobianos durante períodos prolongados. Preferimos el empleo de un microtaladro para hacer un agujero en la cortical ósea a la aguja percutánea, para facilitar la inoculación y por la garantía que nos ofrecía de que ésta fuera correcta.

Con estos trabajos hemos conseguido crear modelos fiables de osteomielitis crónica con bacilos gramnegativos (*E. coli* y *P. aeruginosa*) y *S. aureus*, en los que los signos de la infección ósea eran evidentes a partir del día 14 de la inoculación. Posteriormente nos han servido para valorar la respuesta a varios antimicrobianos. También comprobamos el efecto que tiene la inoculación exclusivamente del sulfato de bario (lesiones esclerosas medulares y destrucción de trabéculas, sin reacción osteoblástica ni fibrosa), así como los provocados por la broca y el taladro (lesiones localizadas con escasa reacción leucocitaria y fibrosa). En el modelo estafilocócico, logramos desarrollar la osteomielitis sin necesidad de sustancia esclerosante, como se venía creyendo hasta no hace mucho tiempo.

Naturalmente, somos plenamente conscientes de las limitaciones que estos estudios tienen en referencia a la osteomielitis humana, que de forma sucinta son las siguientes: a) el uso de una sustancia esclerosante extraña; b) la utilización del microtaladro que parece favorecer la síntesis de prostaglandinas en el hueso y, por tanto, la infección, y c) la administración de inóculos mucho más altos de los que se precisan para que tenga lugar una osteomielitis humana.

En el capítulo terapéutico, hemos demostrado la utilidad de antibióticos como cefotaxima, cefotaxidima, piperacilina e imipenem/cilastatina en el tratamiento de la osteomielitis experimental, que posteriormente ha sido corroborada en la clínica. Más recientemente, hemos comprobado el

efecto beneficioso en la osteomielitis de un factor estimulante de colonias de granulocitos junto a dosis subterapéuticas de clindamicina.

En definitiva, contamos en la actualidad con un modelo de osteomielitis crónica fiable, fácil de desarrollar y económico, que permitirá continuar en el futuro la labor de investigación, que durante una década llevamos realizando.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Cierny G, Mader JT. Adult chronic osteomyelitis. *Orthopaedics* 1984; 7: 1.557-1.564.
2. Sheagren JN. Bone and joint infections. *Curr Opin Infect Dis* 1990; 3: 653-654.
3. Aliabadi P, Nikpoor N. Imaging osteomyelitis. *Arthritis & Rheumatism* 1994; 37: 617-622.
4. Gentry LO. Role of newer beta-lactam antibiotics in treatment of osteomyelitis. *Am J Med* 1985; 78 (Supl 6A): 134-139.
5. Gomis Gavilán M, Ledesma Martín-Pintado F, López Sánchez F. Tratamiento de la osteomielitis crónica. *An Med Intern (Madrid)* 1995; 12: 115-121.
6. Rodet A. Physiologie pathologique-étude expérimentale sur l'osteomyelite infectieuse. *C R Acad Sci* 1885; 99: 569-571.
7. Lexer E. Zur experimentellen erzeugung osteomyelitischer herde. *Arch Klin Chir* 1894; 48: 181-200.
8. Starr CL. Acute hematogenous osteomyelitis. *Arch Surg* 1922; 4: 567-587.
9. Haldeman KO. Acute osteomyelitis. A clinical and experimental study. *Surg Gynecol Obstet* 1934; 59: 25-31.
10. Thompson RHS, Dubos RJ. Production of experimental osteomyelitis in rabbits by intravenous injection of *Staphylococcus aureus*. *J Exp Med* 1938; 68: 191-206.
11. Scheman L, Janota M, Lewin P. The production of experimental osteomyelitis: preliminary report. *JAMA* 1941; 117: 1.525-1.529.
12. Stevens DB. Value of prophylactic penicillin in experimental osteomyelitis. *J Surg Res* 1966; 6: 446-450.
13. Norden CW, Kennedy E. Experimental osteomyelitis I. A description of the model. *J Infect Dis* 1970; 122: 410-418.
14. Andriole VT, Nagel DA, Southwick WO. A paradigm for human chronic osteomyelitis. *J Bone Joint Surg (Am)* 1973; 55A: 1.511-1.515.
15. Van Wingerden GI, Lolans V, Jackson GG. Experimental pseudomonas osteomyelitis. Treatment with sisomicin and carbenicillin. *J Bone Joint Surg (Am)* 1974; 56A: 1.452-1.458.
16. Norden CW, Keleti E. Experimental osteomyelitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* 1980; 141: 71-75.
17. Mader JT, Wilson KJ. Models of osteomyelitis. En: Zak O, Sande MA, editores. *Experimental models in antimicrobial chemotherapy*. Londres: Academic Press, 1986; 2: 155-173.

18. Johansson A, Svensson O, Blomgren G, Eliasson G, Nord CE. Anaerobic osteomyelitis: a new experimental rabbit model. *Clin Orthop* 1991; 265: 297-301.
19. Zak O, Zak F, Rich R, Tosch W, Kradoffer R, Scheld WM. Experimental staphylococcal osteomyelitis in rats: therapy with rifampin and cloxacillin alone or in combination. En: Periti P, Grassi GG, editores. *Current chemotherapy and immunotherapy*. Washington: American Society for Microbiology, 1982; 973-974.
20. Rissing JP, Buxton TB, Weinstein RS, Shockley RK. Model of experimental chronic osteomyelitis in rats. *Infect Immunol* 1985; 47: 581-586.
21. Rissing JP, Buxton TB, Fisher J, Harris R, Shockley RK. Arachidonic acid facilitates experimental chronic osteomyelitis in rats. *Infect Immunol* 1985; 49: 141-144.
22. Nelson DR, Buxton TB, Luu QNL, Rissing JP. An antibiotic resistant experimental model of pseudomonas osteomyelitis. *Infection* 1990; 18: 246-249.
23. Gisby J, Beale AS, Bryant JE, Toseland CDN. Staphylococcal osteomyelitis-a comparison of co-amoxiclav with clindamycin and flucloxacillin in an experimental rat model. *J Antimicrob Chemother* 1994; 34: 755-764.
24. Deysine M, Rosario E, Isenberg HD. Acute hematogenous osteomyelitis: an experimental model. *Surgery* 1976; 79: 97-99.
25. Fitzgerald RH. Experimental osteomyelitis: description of a canine model and the role of depot administration of antibiotics in the prevention and treatment of sepsis. *J Bone Joint Surg (Am)* 1983; 65A: 371-380.
26. Passl R, Muller C, Zielinski CC, Eibl MM. A model of experimental post-traumatic osteomyelitis in guinea pigs. *J Trauma* 1984; 24: 323-326.
27. Emslie KR, Nade S. Acute hematogenous staphylococcal osteomyelitis: a description of the nature history in an avian model. *Am J Pathol* 1983; 110: 333-345.
28. Gomis M, Herranz A, Aparicio P, Fe A, Alonso MJ, Prieto J et al. An experimental model of chronic osteomyelitis caused by *Escherichia coli* treated with cefotaxime. *J Antimicrob Chemother* 1990; 26 (Supl A): 15-21.
29. Gomis M, Barberán J, Gómez-Lus ML, Herranz A, Alonso MJ, Prieto J. Ceftazidime as therapy for experimental osteomyelitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Esp Quimioterap* 1995; 8: 203-206.
30. Gomis M, Herranz A, Aparicio P, Fe A, Barberán J, Alonso MJ et al. Piperacilina en el tratamiento de la osteomielitis experimental en ratas causada por *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Esp Quimioterap* 1995; 8: 128-130.
31. Barberán J, Gomis M, Khorrami S, Ferrández A, López-Arce J, Gómez-Lus ML. Short guide-line of imipenem in the treatment of an experimental model of osteomyelitis by *Pseudomonas aeruginosa* [resumen 191]. Hamburgo, Alemania: 2<sup>nd</sup> European Congress of Chemotherapy and 7<sup>th</sup> Biennial Conference on Antiinfective Agents and Chemotherapy, 10-13 de mayo de 1998.
32. Barberán López J, Ramón J, Sopesén B, Khorrami S, Prieto J, Gomis M. Sub-inhibitory and inhibitory clindamycin concentrations in an experimental model of staphylococcal osteomyelitis [resumen P812]. Lausana, Suiza: 8th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 25-28 de mayo de 1997. *Clin Microbiol Infect* 1997; 3 (Supl 2): 196.
33. Gomis M, Barberán J, Sopesén B, Sánchez B, Khorrami S, Gómez-Lus ML et al. Granulocyte colony-stimulating factor plus subtherapeutic doses of clindamycin in a model of staphylococcal osteomyelitis in rats [resumen M 190]. Hamburgo, Alemania: 2<sup>nd</sup> European Congress of Chemotherapy and 7<sup>th</sup> Biennial Conference on Antiinfective Agents and Chemotherapy, 10-13 de mayo de 1998.

## DISCUSIÓN

- J.M. GATELL: ¿Cuántos días después de la inoculación comienza el tratamiento?
- J. BARBERÁN: El tratamiento se inicia a las 2 semanas después de la inoculación.
- J.A. CAPDEVILA: Después de practicar el agujero con el taladro, ¿el inóculo se deposita dentro de la cavidad medular del hueso, o bien se enclava la aguja en el hueso?
- J. BARBERÁN: Primero realizamos el agujero con el microtaladro; a continuación retiramos el microtaladro e introducimos la aguja en la cavidad libre medular, donde se inyecta el inóculo.
- J.A. CAPDEVILA: Si el líquido inoculado queda libre dentro de la cavidad medular, con vuestro modelo ¿no crees que realmente inducís una osteomielitis difusa?

- J. BARBERÁN: Procurando no perforar con el microtaladro la otra parte de la cortical de la tibia de la rata, el líquido queda libre dentro de la cavidad medular. Al quedar el inóculo en cavidad medular, se induce una osteomielitis extensa, pero a pesar de ello y como se ha podido comprobar con las imágenes que hemos presentado, no se ven afectadas ni toda la cavidad ni toda la cortical del hueso, sino que la osteomielitis queda localizada en el punto de inoculación.
- J. GAVALDA: Una recomendación técnica que os podría servir para evitar los problemas de homogeneización de los huesos es congelar los huesos a - 80 °C con nitrógeno líquido y después, con un mortero o martillo neumático, se

tritura el hueso congelado y se obtiene un polvo muy bien homogeneizado. Por último, me gustaría saber tu opinión sobre la posibilidad de curación de la osteomielitis con estos modelos. Todos sabemos que en la osteomielitis crónica con abscesos de Brodie, sin cirugía, la curación es muy difícil; en cambio, con estos modelos de osteomielitis, algunos tratamientos consiguen la curación.

J. BARBERÁN: El problema del tratamiento de la osteomielitis no es que el antibiótico no llegue al hueso. Como todos sabemos el hueso es un órgano totalmente difundido y no tiene ninguna barrera anatómica que impida el acceso del antibiótico. Sin embargo, el problema del tratamiento de la osteomielitis, sobre todo la crónica, es que se forma un macroacceso que actúa en forma de secuestro y éste dificulta que el antibiótico acceda al agente infeccioso. En el modelo experimental en rata, el absceso o el *nidus* que inducimos es microscópico, se trata de un microabsceso, y por ello el antibiótico accede fácilmente a él. La valoración se realiza posteriormente a través del estudio histopatológico y por el recuento de unidades formadoras de colonias y, a pesar del tratamiento, no siempre obtenemos la erradicación de la infección.

J. GAVALDÀ: ¿En algún momento alguien se ha planteado dejar más tiempo entre la infección y el inicio del tratamiento, a fin de los abscesos adquieran un tamaño superior y ello dificulte tratamiento antibiótico?

J. BARBERÁN: No sé exactamente lo que ocurriría si iniciásemos el tratamiento más tarde. Lo comenzamos después de la segunda semana de la inoculación basándonos en la diferenciación, más o menos aceptada, entre osteomielitis aguda y crónica, que se establece cuando el proceso infeccioso perdura más de 2 semanas. Con este modelo constatamos que en el grupo control la infección perdura. Cuando realizamos sacrificios a los 7, 14, 28 y 56 días de tratamiento, se observa al principio el *nidus* característico, como una infección necrosante supurativa aguda y, después, evoluciona con una reacción inflamatoria periférica, probablemente como intento de controlar la infección por parte del sistema inmunitario del animal.

J. ARIZA: De todas formas y desde un punto de vista clínico, vuestro modelo se parece más a una osteomielitis aguda que a la propia osteomielitis crónica. Ante una osteomielitis aguda hematógena, generalmente por *Staphylococcus aureus*, de entrada será necesario plantear un tratamiento prolongado, de al menos 3-4 semanas, con antibióticos. La cuestión está en sa-

ber si estas osteomielitis hematógenas pueden curarse sólo con antibióticos o, además, es necesario el desbridamiento quirúrgico. En cambio, la osteomielitis crónica, según el criterio clínico clásico, implica la cirugía como un requisito casi imprescindible para alcanzar la curación. El tratamiento antibiótico prolongado aplicado en vuestro modelo experimental alcanza la curación, mientras que no cura si dicho tratamiento no es prolongado. Por este motivo, e independientemente de que sirva para evaluar eficacia de antibióticos, creo que el modelo acaba asemejándose más a la osteomielitis hematógena. Finalmente, me gustaría que comentarais cómo analizáis vuestros resultados al compararlos con los publicados en la bibliografía. Es decir, de las experiencias de Norden que son las más conocidas, una de las cosas que siempre me ha llamado la atención es que los resultados como, por ejemplo, en la osteomielitis estafilocócica con cloxacilina, eran relativamente deficientes y, en cambio, los resultados eran buenos cuando hablamos de clindamicina y rifampicina. Esto nos devuelve otra vez a una conversación anterior sobre la importancia de las bacterias adherentes en infección ósea, independientemente de que haya o no cuerpo extraño. Y, después, en la infección por gramnegativos según los experimentos de Norden, los betalactámicos han sido relativamente cuestionados y, de alguna forma, las quinolonas se comportarían como antibióticos muy superiores en la infección por *Pseudomonas aureuginosa*. A partir de estos resultados y de los comentarios de Joan Gavalda, creo que el modelo no acaba de simular el concepto clínico que tenemos de osteomielitis crónica.

J. BARBERÁN: A todo hay que ponerle un límite desde el punto de vista conceptual: la mayoría de autores aceptan los 14 días como el punto de inflexión de una osteomielitis aguda a una osteomielitis crónica. Pero dentro de las crónicas pueden existir también diferencias muy evidentes. El caso extremo serían las osteomielitis de años de evolución en pacientes con heridas de guerra y que se caracterizan por continua supuración. Siendo una osteomielitis crónica también, es recidivante y poco se parece a la crónica de un mes de evolución. La afectación del hueso es total, existe una pandiafisitis, con clara imagen radiológica de secuestro. En estas situaciones se requiere limpieza quirúrgica del hueso y tratamiento con antibióticos. Pero la osteomielitis crónica más frecuente en la actualidad y en la que deberíamos centrar los esfuerzos para su tratamiento es la posquirúrgica o la

postraumática, que suele diagnosticarse con cierto retraso a pesar de disponer de tomografía computarizada o resonancia magnética. Estas osteomielitis se curan con desbridamiento quirúrgico y antibioterapia prolongada. En segundo lugar, el modelo que hemos presentado no es ni mucho menos parecido a la osteomielitis hematógena: existe una inoculación en la tibia, es una osteomielitis contigua, remeda a la fractura abierta, a la posquirúrgica, a la postraumática, a la infección de partes blandas, etc., pero no hay diseminación hematógena de la infección, y si se deja evolucionar durante más de 14 días, entraríamos en el concepto de cronicidad. Por tanto, convendría diferenciar entre las osteomielitis agudas, las crónicas de más de 14 días y, finalmente, aquellas con posibilidades muy limitadas de tratamiento y que suelen acabar en amputación. Dentro de este contexto, nos interesa el segundo tipo, la osteomielitis que tarda un poco en diagnosticarse y que la podemos curar con tratamiento quirúrgico y con tratamiento médico. Por último, y en referencia con los trabajos de Norden, podría contestarte que es un autor que ha estudiado prácticamente todos los antibióticos y que tanto con quinolonas como con betalactámicos ha obtenido buenos resultados. Nosotros empleamos las mismas técnicas de valoración, con la única diferencia de que lo estudiamos en conejo y que la inoculación la realizamos con aguja percutánea.

J. ARIZA: Mis comentarios venían a colación de que no estoy tan convencido sobre la posición de los betalactámicos en osteomielitis complicadas. Los modelos previos de Norden iban en esta dirección, al dudar de la eficacia de cloxacilina como agente estafilocócico idóneo. Y en el caso de las infecciones por gramnegativos, sobre todo las más difíciles como *Pseudomonas*, atribuían una clara superioridad a las quinolonas respecto a la terapéutica exclusiva con betalactámicos. Esto enlazaba con el tema de las bacterias adherentes, porque los antibióticos betalactámicos se influyen muchísimo en su alteración de la concentración mínima bactericida (MBC) cuando están en fase frente a las bacterias; al menos con *S. aureus* esto está claro, y no sé si también ocurre en bacilos gramnegativos.

J. BARBERÁN: Está claro que la osteomielitis es una infección por bacterias adherentes. Pero, a pesar de ello, y desde una óptica estrictamente

clínica, está claro y demostrado que los betalactámicos son antibióticos muy eficaces. Las quinolonas no lo son menos, pero tal vez han aportado una mayor comodidad de empleo. Hoy día utilizamos fundamentalmente quinolonas en el tratamiento de la osteomielitis porque se pueden administrar por vía oral, o bien inicialmente por vía intravenosa y posteriormente oral como tratamiento extrahospitalario. Los betalactámicos, por vía i.v., obligan a realizar el tratamiento durante un mes o seis semanas con el paciente ingresado. En cuanto al tema del *slime*, con dosis subterapéuticas de clindamicina intentamos comprobar si se producía una disminución de las colonias. Existen datos previos de Mader quien, utilizando dosis subinhibitorias, no subterapéuticas, de clindamicina ha conseguido inhibir las adherencias bacterianas. El trabajo se complementa con imágenes de microscopía electrónica en las que se observan los efectos antiadherentes de la clindamicina, con desaparición de *S. aureus* del hueso.

F. GUDIOL: En mi opinión la división de las osteomielitis en agudas y crónicas es una fuente de conflicto. Probablemente las únicas osteomielitis agudas son las hematógenas, quizás en el niño, que deben ser tratadas con rapidez e iniciar un tratamiento precoz a veces con datos clínicos mínimos. Por ello, creo que sería recomendable evitar los términos osteomielitis aguda y crónica. Es más esclarecedora la clasificación por mecanismo patogénico: hematógenas, postraumática, por contigüidad, etc.

J. BARBERÁN: A modo de resumen, creo que la clasificación entre aguda y crónica tiene básicamente interés desde el punto de vista de pronóstico. Una osteomielitis aguda, por el mecanismo patogénico que sea, requerirá exclusivamente tratamiento antimicrobiano, mientras que una osteomielitis crónica, del mecanismo que sea, va a necesitar desbridamiento quirúrgico más tratamiento antimicrobiano. Por otro lado, existen numerosas clasificaciones de osteomielitis, aparte de agudas y crónicas, atendiendo a Van Vogel, por contigüidad, hematógenas, las de Cierny según la afectación del hueso, según los microorganismos que la causan, etc.

J.M. GATELL: A fin de simular la osteomielitis hematógena, ¿a nadie se le ha ocurrido inyectar por vía intravenosa sulfato de bario y después el estafilococo?

J. BARBERÁN: No, que yo sepa.

---

# Cómo debe organizarse un estabulario con modelos de patología infecciosa

---

Mariano Domingo<sup>a,\*</sup>, Jordi Cantó<sup>b</sup> y Joan Pujols<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Departament de Patologia i Producció Animals y <sup>2</sup>Servei d'Estabulari. Universitat Autònoma de Barcelona.

<sup>c</sup>Unitat de Sanitat Animal. IRTA. Barcelona.

## RESUMEN

El estabulario con modelos infecciosos debe organizarse para evitar infecciones a personas y animales, y su diseminación hacia el exterior de la instalación. La estructura general más utilizada de una instalación de seguridad de grado 3 es un edificio con tres niveles, con tratamiento de aire filtrado en el nivel superior, zonas de trabajo en el nivel intermedio y tratamiento de residuos en planta inferior. Debe prestarse especial atención al recubrimiento resistente de superficies, a las conducciones y al sellado de juntas para lograr la hermeticidad. Las vías de entrada y salida de material y de animales deben garantizar la estanqueidad, mediante esclusas (*airlocks*) o autoclaves. El acceso de personal debe ser restringido, a través de vestuarios y duchas obligatorias, al menos de salida. Los circuitos de agua, aire, vapor, gases y vacío deben disponer de válvulas antirretorno y filtros que impidan la contaminación de la red general, y los desagües han de tener sifones que garanticen su estanqueidad. Los restos sólidos y líquidos requieren su esterilización antes de su eliminación al exterior de la instalación. Por lo que respecta a los restos de los animales, la incineración es el tratamiento de elección. El edificio ha de tener ambiente regulado, con mantenimiento de gradientes de presión adecuados. Los materiales utilizados para albergar los animales deben resistir la desinfección. La utilización de modelos de patología infecciosa en un animalario genera un riesgo de infección. Las exigencias planteadas dependen del grado de peligrosidad del microorganismo y de la especie animal a utilizar.

### Palabras clave:

Animales de laboratorio. Recomendaciones de seguridad. Gnotobiología.

## HOW TO ORGANIZE THE ANIMAL FACILITIES IN EXPERIMENTAL INFECTIOUS DISEASES MODELS

Animal facilities for research in infectious diseases are organised in order to avoid risk of infection to person and animals, and dissemination of microorganisms outdoors. The usual design of a facility in biosecurity level 3 is an upper floor with treatment and filtering of air, work area in the middle, and treatment of waste on the lower level. Attention has to be paid to special covering of walls, and to sealing of junctions, to achieve containment. Entry and way out of materials and animals of the building has to be done by airlock or autoclave, to maintain containment. Personal access has to be controlled, and done through rooms for change of dress, equipped with showers at least obligatory when going out of the facility. Air, water, and gas conductions should be equipped with an anti-return valve to avoid contamination of the general circuit. Solid and liquid waste must be sterilised before disposal to the outside of the building. Incineration is the best choice for disposal of animal carcasses. The building has to regulate ambient conditions such as temperature, air humidity, illumination and exchange of air. Pressure gradients between rooms have to be maintained. The equipment for animal must be of materials resistant to disinfection and autoclaving. Animal infectious models generate a risk of infection for humans. The needs to prevent the risk depend on the characteristics of the microorganism itself and the animal species to be used.

### Key words:

Laboratory animals. Biosafety guidelines. Gnotobiology.

---

\*Correo electrónico: domingo@cc.uab.es.



## Introducción

El estabulario con modelos de patología infecciosa debe organizarse para lograr tres objetivos esenciales: *a)* evitar las infecciones desde el animal del modelo experimental hacia las personas en contacto (zoonosis); *b)* impedir la diseminación de infecciones (infecciones cruzadas) entre los grupos de animales experimentales, y *c)* evitar la diseminación de los agentes infecciosos hacia el exterior de la instalación. Estos objetivos son alcanzables mediante la aplicación de diversos grados de seguridad biológica, o bioseguridad, definida como el manejo seguro de agentes infecciosos de alto riesgo. La bioseguridad en un estabulario con modelos de patología infecciosa requiere instalaciones y procedimientos suplementarios a los existentes en los estabularios de mantenimiento y producción. La bioseguridad se consigue con sistemas de aislamiento hermético, gradientes de presión, filtración de aire, tratamiento de desechos y efluentes, y procedimientos adecuados (fig. 1). A continuación se describen las características de las instalaciones y los procedimientos propios de un estabulario con modelos de patología infecciosa, así como los criterios generales sobre peligrosidad de los agentes infecciosos y medidas de contención.

## Características de un centro para trabajar con modelos experimentales en patología infecciosa

Un centro destinado a desarrollar estudios que utilicen animales como modelos experimentales en patología infecciosa debe cumplir con los mis-

mos requisitos propios de cualquier otro centro en el que se realice experimentación animal y, además, con los específicamente derivados de las medidas de seguridad que este tipo de estudios requiere.

El diseño del centro, la distribución de espacios, la situación y circuitos de conexión entre los mismos, y la definición de las características constructivas, así como del equipamiento necesario, debe ser fruto de un trabajo coordinado entre el equipo de investigadores que van a utilizar el centro y el de profesionales de la arquitectura y la ingeniería, a ser posible con experiencia en la construcción de este tipo de instalaciones.

Existen distintas publicaciones que pueden ser utilizadas para obtener información sobre las características básicas que debe poseer un estabulario de contención.

El esquema general para investigar con animales infectados experimentalmente es el de una caja dentro de otra caja, con el objetivo de impedir cualquier posible diseminación de los microorganismos con los que se trabaja. El diseño actualmente más utilizado es el de un edificio con tres niveles: el superior alberga todos los sistemas de tratamiento (climatización y filtración absoluta) del aire impulsado y extraído de todo el centro; en el intermedio se sitúan las distintas zonas de trabajo (estabulación de animales y laboratorios), así como los sistemas de acceso (vestuarios y duchas) para el personal, y la planta inferior se destina a la zona de tratamiento (descontaminación y esterilización) de los efluentes líquidos y desechos sólidos que así lo requieran, así como a local técnico para el control del conjunto de instalaciones.

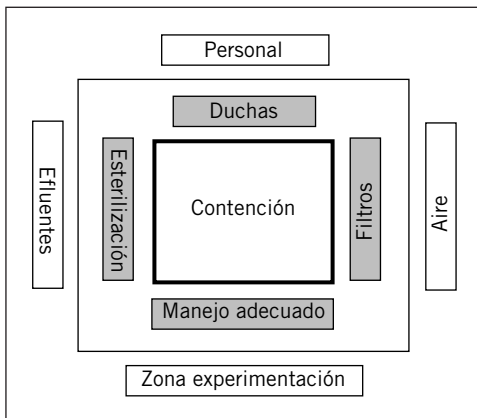


Fig. 1. Procedimientos generales de contención biológica.

## Diseño y construcción de un estabulario para modelos infecciosos

Con el fin de disponer de unas instalaciones duraderas y reducir al mínimo tanto el mantenimiento como las posibles averías y las actuaciones correctivas que estas conllevan, es imprescindible utilizar en la construcción de estos centros materiales de primera calidad. Así mismo, deben situarse fuera de las áreas de trabajo (en la planta técnica) todas aquellas instalaciones y equipos que deban estar sujetos a mantenimiento y posibles reparaciones. Cuando esto no sea posible, debe optarse por la solución de dejar accesibles (no empotradas) las instalaciones y conducciones que deben estar situadas obligatoriamente dentro de los locales de experimentación o de mantenimiento de animales. Todas las superficies (techos, paredes y suelos) deben es-

tar recubiertas con materiales lisos y no porosos, resistentes al agua y a los productos químicos (desinfectantes) relativamente agresivos, que soporten sin deteriorarse el esfuerzo que implicará la circulación de materiales pesados o la presencia de animales. El recubrimiento de las superficies debe realizarse con estructuras monolíticas o con un mínimo número de juntas, debidamente selladas. La aplicación de compuestos vinílicos o de resinas epoxi proporciona excelentes resultados en estos aspectos. Los ángulos entre paredes, techos y suelos deben ser redondeados para evitar rincones difíciles de limpiar y desinfectar. Deben sellarse todas las posibles juntas entre paredes y marcos de las puertas o alrededor de las conducciones que atraviesen las paredes. Las conducciones que deban circular por el interior de las salas se instalarán lo suficientemente separadas de la pared a la que estén sujetas, de modo que se facilite su limpieza y desinfección. Así mismo, se evitarán en lo posible los recorridos horizontales (más propensos a acumular polvo) priorizando los recorridos verticales. Las puertas, de dimensiones adecuadas a los materiales o animales que deberán transitar por las mismas, deben seguir el mismo esquema de garantizar una estanqueidad absoluta de los locales que así lo requieran respecto a las zonas contiguas. Pueden disponer de mirillas que permitan inspeccionar el interior sin necesidad de acceder a la sala. Conviene que las puertas de acceso general al centro y a las zonas de seguridad estén equipadas con sistemas de limitación de apertura, mediante tarjetas o cerraduras conectadas a sistemas eléctricos codificados. El acceso a las zonas de mayor control, tanto para personas como para animales o materiales, debe efectuarse a través de una zona de transición, esclusa o *airlock*, que impida el contacto directo de estas salas con los espacios circundantes. El acceso del personal debe disponer de vestuarios, con taquillas diferenciadas para la ropa de calle y la de trabajo, equipados con duchas de utilización obligatoria, por lo menos al salir de las zonas controladas hacia el exterior. Los circuitos de agua, aire, vapor, gases y vacío deben disponer de válvulas antirretorno y filtros que impidan la contaminación de la red general; los desagües deben dotarse de sifones de seguridad y de tapas roscadas o con bloqueo, que garanticen su estanqueidad cuando no están en uso o se procede a esterilizar una habitación. Deben estudiarse detenidamente los sistemas de comunicación interna y con el exterior, tanto por razones de seguridad como para evitar la circulación innecesaria del personal entre las distintas áreas.

## **Eliminación de residuos sólidos y líquidos**

En un estabulario de enfermedades infecciosas se generan restos sólidos y líquidos que requieren su esterilización antes de su eliminación al exterior de la instalación. El diseño general es el de un autoclave de doble puerta, intercalado en la frontera de la zona de contención con la zona externa a la instalación. La especie animal utilizada en el modelo experimental implica soluciones diferentes a la esterilización de restos sólidos y líquidos. Así, en el caso de animales pequeños, los excrementos, los restos de alimento y la cama pueden ser autoclavados, y eliminados como residuos urbanos. En cambio, si se trata de especies mayores, como rumiantes pequeños o cerdos, la orina y los excrementos son recogidos por desagües a colectores para la esterilización por calor o mediante ciclos de acidificación-alcalinización.

Por lo que respecta a los restos de los animales, la incineración es el sistema de tratamiento de elección. En el caso de no disponer de incinerador en la instalación, se puede optar por el autoclavado de los restos, siempre garantizando que la temperatura de esterilización se alcanza en el interior de los cadáveres, y no sólo superficialmente.

## **Zonas para estabulación de animales**

Los espacios destinados a albergar animales se pueden subdividir en zonas de cuarentena, de estabulación general y de estabulación especializada para los animales infectados. Su diseño se realizará en función de las especies a estabular, que pueden mantenerse en régimen de semilibertad (especies grandes) o en jaulas, que, a su vez, pueden proporcionar un segundo nivel de aislamiento, ya sea mediante la utilización de cubiertas filtrantes o manteniéndolas dentro de cabinas de seguridad o de aisladores. En cualquier caso, las salas de estabulación de animales deben proporcionar un nivel suficiente de aislamiento entre las distintas especies y líneas de trabajo.

### *Zonas de cuarentena*

Resultan imprescindibles para aislar preventivamente los animales que se introducen en la instalación antes de proceder a su estabulación en las áreas experimentales. La duración de la cuarentena (que puede oscilar entre una o dos semanas para roedores y un período no inferior a los 2 meses para primates no humanos) ha de

permitir garantizar, mediante el desarrollo de técnicas de control y diagnóstico adecuadas a cada especie, que los animales no sufren o no son portadores de ninguna enfermedad que pudiera afectar a otros animales ya estabulados o interferir con los estudios en los que van a participar. El período de cuarentena resulta también necesario para permitir que los animales se recuperen del estrés y desequilibrio fisiológico que siempre comporta un transporte, así como que se habitúen a las nuevas condiciones de estabulación, alimentación y manejo.

### *Zonas de trabajo*

El edificio debe incorporar también las zonas de trabajo (laboratorios, quirófanos, sala de autopsias) necesarias para desarrollar las distintas técnicas que los procedimientos experimentales puedan requerir. La zona de autopsias debe comunicar con el horno crematorio u otro sistema establecido para la esterilización y eliminación de los cadáveres y muestras contaminadas. El diseño de estas zonas ha de cuidar de forma especial la posible generación y circulación de aerosoles. Conviene disponer también de una cámara frigorífica o congelador de dimensiones adecuadas para el mantenimiento temporal de los cadáveres y residuos que posteriormente han de eliminarse.

### *Zonas de almacén*

El centro debe disponer de una serie de zonas de almacenamiento de productos y materiales debidamente distribuidas y con capacidad suficiente tanto para mantener en zonas separadas los productos que así lo requieran, como para garantizar unos niveles de almacenaje de productos fungibles, que permitan una cierta autonomía en caso de fallo en los suministros.

## **Condiciones ambientales de las salas para animales**

Los alojamientos para animales han de ser confortables, higiénicos y de dimensiones suficientes. Además, deben disponer de sistemas de regulación del ambiente, como renovación del aire y mantenimiento de los gradientes de presión adecuados, control de la temperatura y humedad relativa, iluminación, nivel de ruidos, etc., que garanticen el bienestar de las especies allí mantenidas. En general, la normativa sobre manejo de animales es aplicable también a los animales de experimentación. Sobre los animales

domésticos existe una gran cantidad de documentación de las necesidades de espacio por especie en las granjas de producción.

### *Ventilación*

La ventilación de los locales de alojamiento de los animales debe proporcionar un nivel suficiente de renovación del ambiente, que en casos de alta ocupación significa renovar (sin recirculación) el aire 20 veces por hora. El aire impulsado debe ser previamente acondicionado para facilitar el mantenimiento de una temperatura y humedad relativa acorde a los requerimientos de comodidad de cada especie, evitando las fluctuaciones importantes en estos parámetros. Las instalaciones con sistema de ventilación artificial deben garantizar un nivel suficiente de renovaciones de aire en las jaulas. Los flujos de aire no deben resultar molestos para los animales y han de estar distribuidos de manera que garanticen una correcta ventilación de todo el local, evitando zonas muertas. Tanto el aire de impulsión (para evitar la vehiculación de posibles patógenos del exterior) como el de extracción (para evitar la contaminación de otros locales anexos o del ambiente) deben ser filtrados a través de filtros absolutos (HEPA) que generalmente se duplican por razones de seguridad. La ventilación debe asegurar la disminución de la formación de aerosoles e impedir las infecciones cruzadas.

En instalaciones cerradas y con un sistema de ventilación artificial, es necesario disponer de un sistema de emergencia para asegurar la ventilación.

El balance entre impulsión y extracción permitirá establecer los gradientes de presiones diferenciales entre las distintas zonas, entre las zonas y los pasillos y con el exterior del edificio, de modo que se prevenga la circulación de aire desde las zonas de mayor riesgo hacia las de menor contaminación.

### *Ruido*

El ruido es un factor estresante, y puede tener efectos negativos sobre la fertilidad, prolificidad (abortos), canibalismo, abandono de camadas, etc. El control sonoro ha de garantizar que los animales no se verán afectados por los ruidos derivados del funcionamiento de los distintos equipos, así como por los generados por otros animales que se mantengan en zonas próximas. La instalación ha de estar diseñada de forma que el alojamiento de los animales esté alejado de la

zona de máquinas. Si no es así, es necesario aislar acústicamente la zona de estabulación (para no superar 85 db en el interior de las salas con animales más sensibles). Es recomendable reducir la intensidad de alarmas, timbres, ruidos de puertas, teléfonos, etc.

### *Iluminación*

Los parámetros a tener en cuenta en referencia a la iluminación son su intensidad, el espectro y el fotoperíodo. La intensidad de la luz en el área ocupada por los animales (mínimo 15 lux en el área ocupada por animales y de 5 lux en el caso de aves domésticas), los períodos de iluminación y oscuridad, así como los cambios de iluminación deben cumplir con las necesidades de los animales. La intensidad muestra variaciones en las jaulas o cubículos colocadas en estanterías según el tipo de jaula, tipo de cubierta y nivel que ocupa. Estas variaciones deben reducirse al mínimo. Se ha de seleccionar el fotoperíodo más adecuado para cada especie, manteniéndolo constante. Para ello, es necesario evitar la entrada de luz no controlada. La iluminación artificial no debe ser superior a 16 h de duración y no ha de producir parpadeo perceptible.

### *Temperatura*

La temperatura ambiental tiene efectos imprevisibles sobre los resultados experimentales.

Las temperaturas fuera del rango confortable modifican los requerimientos en animales recién nacidos, y afectan la fertilidad, la producción de leche, la toxicidad de algunos productos, las variables hemáticas y plasmáticas, el consumo de alimento y agua, el peso de algunos órganos, y la susceptibilidad a infecciones. Es necesario prestar atención a la diferencia de temperatura que se produce entre el exterior y el interior de la jaula, especialmente en las jaulas con rejillas filtrantes (diferencias de hasta 5 °C).

### *Humedad*

La humedad puede producir efectos adversos tanto a niveles bajos como elevados, efectos que pueden agravarse según sea la temperatura ambiente. La humedad afecta la formación de aerosoles y polvo, la producción de amoníaco, la viabilidad de microorganismos, y modifica la actividad mucociliar. Los valores obtenidos en el interior de la sala pueden variar según el nivel de la jaula y según el tipo de lecho, la frecuencia de intercambio, y la utilización de rejillas filtrantes.

### *Partículas en el aire*

La concentración y tiempo de permanencia dependen de una gran cantidad de factores.

Presentan un factor de riesgo e irritación para los animales y el personal. Las partículas de origen externo se controlan con filtros. Las de origen interno mediante la disposición adecuada de los conductos de impulsión y retorno de la ventilación, el número de renovaciones/h, la velocidad del aire, la humedad y la temperatura.

También contribuyen el diseño de la jaula, el tipo de cubierta, el tipo de cama, la periodicidad de limpieza, el tipo de dieta, la población animal por jaula (nivel de actividad) y la especie animal.

### *Suelos y jaulas*

Si los animales descansan sobre el suelo, éste debe ser fácilmente lavable, no deslizante y seco. Ha de disponer de zonas apropiadas para el descanso confortable.

Los suelos enrejillados, en *eslats* o perforados, deben ser adecuados para la especie y el tamaño de los animales alojados. Los suelos con *eslats* deben estar levantados y las piezas no deberían poder salirse, para evitar accidentes.

Las jaulas han de ser adecuadas para cada especie, situación fisiológica y edad.

En la elección de la jaula han de tenerse en cuenta los requerimientos de superficie y altura, y de capacidad de comederos o tolvas, y bebederos, según especie y número de animales a albergar. Han de presentar facilidad de acceso, y han de estar diseñadas para disminuir el riesgo de contaminación de la dieta y del agua. Han de ser resistentes, para no ser deterioradas por el animal, y resistir los desinfectantes y la esterilización en el autoclave.

Además, no han de presentar riesgo de lesión, ni para el animal, ni para el personal que las manipula y limpia.

### *Tratamiento del agua de bebida de los animales*

Con el fin de garantizar que no se introducirán contaminaciones a través del agua de bebida de los animales, se pueden recurrir a distintos sistemas de tratamiento de la misma. Además de proceder a su descalcificación (si las condiciones de dureza del agua así lo aconsejan) con el fin de evitar problemas en las conducciones, se puede garantizar una correcta calidad microbiológica de la misma a través de sistemas físicos, químicos o de combinación de ambos. Los sistemas físicos

recurren a la filtración, al tratamiento térmico o a la irradiación con rayos ultravioletas. Los químicos utilizan la cloración y la acidificación (pH 2,5) del agua de bebida. Como posible ventaja de los procedimientos químicos cabe destacar su efecto residual, de gran utilidad en aquellos casos en que se utilizan sistemas de bebida automatizada, con recorridos largos a través de conductos en que el agua fluye con un bajo caudal.

### *Condiciones de ambiente en salas de roedores*

A modo de resumen, se indican las condiciones ambientales aceptables en las salas de roedores: temperatura 13-18 °C, valores críticos por debajo de 10 °C y por encima de 25 °C, y evitar cambios bruscos. Ausencia de NH<sub>3</sub>. Microbismo inferior a 2.000 unidades formadoras de colonias (UFC)/μl o incluso nulo en condiciones de aislamiento especial. Humedad del 60-70 %. La velocidad del aire no debe superar los 0,15 cm/s. Nivel de ruidos mínimo.

### **Desinfección**

Los procesos de limpieza, desinfección y esterilización resultan de crucial interés en cualquier instalación para animales de laboratorio, incrementándose su necesidad en aquellos casos en que se trabaja con infecciones experimentales. Definir un buen programa en este sentido requiere un elaborado estudio en distintos aspectos. Además de los ya considerados al hablar de las características constructivas, debe ser objeto de consideración la elección de los materiales utilizados para albergar los animales. En el caso de las especies pequeñas, las jaulas utilizadas deberán ser de materiales que resistan la desinfección química y la esterilización por autoclavado. Existen actualmente productos que garantizan unas buenas prestaciones en estos aspectos, generalmente jaulas de makrolón resistente a altas temperaturas. Los complementos (rejillas, tapones de los biberones, comederos, etc.) deberán ser de acero inoxidable. Las estructuras necesarias para enjaular o estabular las especies más grandes, así como las estanterías donde se sitúan las jaulas de conejos y roedores, también deben ser de acero inoxidable, y disponer de la posibilidad de ser desmontadas fácilmente en subunidades que, por sus dimensiones, permitan su transporte y esterilización en autoclave. La decisión del protocolo de limpieza y desinfección debe ser acorde con los diseños experimentales que se desarrollen y su mayor o menor factor de riesgo.

Existen en el mercado multitud de productos y técnicas que deben ser evaluadas con el consejo del fabricante tanto en su selección como en el posterior proceso de aplicación. Debe tenerse bien presente que las condiciones de aplicación resultan críticas para la obtención del nivel de eficacia requerido. La cantidad de material cargado en un autoclave y su distribución dentro del mismo pueden hacer que un mismo programa de esterilización (tiempo-temperatura) resulte más o menos eficaz. La existencia de partículas en un sistema de tratamiento por rayos ultravioletas puede rebajar considerablemente las prestaciones del mismo. En los casos de desinfección química, la dureza del agua empleada, el pH y la temperatura de uso de la solución, el tiempo de contacto, las características del material a tratar, la concentración del producto activo, y su antigüedad desde la fecha de preparación, son factores que van a condicionar su eficacia. Así mismo, deben tenerse presentes las posibles interferencias, durante su aplicación o por efectos residuales, con los animales de experimentación. Existen publicaciones especializadas que orientan sobre las mejores aplicaciones en función de las necesidades del centro, pero de forma general en la tabla I se resumen las principales aplicaciones.

### **Equipamientos adicionales**

Además de los ya mencionados anteriormente, un centro de estas características debe disponer obligadamente de un sistema de generación de energía eléctrica autónomo, con puesta en marcha automática en caso de fallo del suministro eléctrico normal. Este generador debe tener potencia y capacidad de autonomía suficiente para garantizar el correcto funcionamiento de todos aquellos sistemas de ventilación, acondicionamiento ambiental, iluminación y equipos básicos para garantizar la supervivencia de los animales mantenidos y la continuidad de todos aquellos procesos que establecen la barrera de contención entre el centro y el ambiente exterior. Estos equipos deben ser sometidos periódicamente a pruebas de correcto funcionamiento que garanticen su operatividad cuando, ocasionalmente, puedan resultar necesarios. Debe preverse también una zona específicamente diseñada para equipos de limpieza, desinfección y esterilización de materiales, y productos que así lo requieran, incluyendo las jaulas y complementos utilizados en la estabulación de los animales. Tanto por razones de seguridad dadas las características del centro, como por razones éticas

TABLA I  
PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS DESINFECTANTES MÁS USADOS

<p><b>Hipoclorito sódico</b> Enérgico agente oxidante, activo contra la mayoría de microorganismos, pero corrosivo para los metales. Se utiliza generalmente a la concentración de 1-5 g/l (1.000-5.000 ppm) de cloro activo. En presencia de materia orgánica se aumenta la concentración hasta los 10 g/l (10.000 ppm) de cloro libre</p> <p><b>Formaldehído</b> Suele comercializarse a una concentración de 370 g/l (37 %) en la solución conocida como formol. Aplicado a la concentración de 50 g/l (5 %) de ingrediente activo, constituye un buen desinfectante líquido eficaz para los virus de la hepatitis B o de Ebola-Marburg. Su vaporización o micronebulización (6 ml de formol/m<sup>3</sup> de local) o la despolimerización (10,79 ml de paraformaldehído/m<sup>3</sup> de local) proporciona un excelente método para desinfectar salas y edificios. Su actuación, que requiere unas condiciones ambientales de temperatura no inferior a los 21 °C y de humedad relativa superior al 70 %, debe mantenerse durante un tiempo de 8 h, transcurridas las cuales se procede a su eliminación mediante ventilación del espacio con aire limpio o neutralización mediante carbonato de amonio</p> <p><b>Compuestos fenólicos</b> Aunque menos eficaces frente a virus que los hipocloritos, existen productos eficaces frente a virus, rickettsias, hongos y bacterias vegetativas, siendo poco activos frente a formas esporuladas</p>	<p><b>Iodóforos</b> Su acción es parecida a la de los hipocloritos. Debido a su neutralización por la presencia de materia orgánica, deben aplicarse sobre superficies limpias, con soluciones que contengan 0,075 g/l (75 ppm) de yodo activo. Diluidos en alcohol etílico al 50 %, a la concentración de 1.600 ppm de yodo activo, se utilizan para el lavado de manos o como esporicidas. A concentraciones de 0,45 g/l (450 ppm) son eficaces frente a los virus de la fiebre de Lassa y de Ebola-Marburg</p> <p><b>Ácido peracético</b> Se trata de un producto muy potente que puede considerarse un esterilizante, lo que le ha convertido en una de las principales opciones en la tecnología gnotobiológica, a pesar de su alta corrosividad frente a los metales y gomas, así como su fuerte olor y su rápida degradación una vez preparada la dilución de uso</p> <p><b>Alcoholes</b> Los alcoholes etílicos e isopropílicos, a concentraciones del 70-85 %, son utilizados para desinfección rápida de superficies</p> <p><b>Compuestos de amonio cuaternario</b> Detergentes catiónicos muy eficaces para la desinfección de superficies. Se fijan a las proteínas, por lo que pierden eficacia por contacto con materia orgánica. Carecen de actividad esporicida o virucida (virus hidrofílicos), pero sus características de olor débil, ausencia de corrosividad, estabilidad de las soluciones y baja toxicidad han favorecido su implantación</p>
---	--

debido a los animales albergados, conviene disponer de un sistema de alarmas que detecte cualquier fallo que pueda repercutir en la integridad de sistema de barreras o en la supervivencia de los animales. Estos sistemas de alarma no deben resultar estresantes para las especies mantenidas y deben ser detectables desde el exterior, comunicando con un servicio permanente de seguridad.

**Seguridad biológica y riesgo de transmisión de agentes infecciosos a las personas**

La utilización de modelos de patología infecciosa en un animalario genera un riesgo de

infección hacia los manipuladores y experimentadores en contacto con esos animales. Las exigencias planteadas en cada caso vienen determinadas, fundamentalmente, por el grado de peligrosidad (hacia la especie humana, pero también en general hacia las especies animales) del agente infeccioso en cuestión, y por la especie animal a utilizar en el modelo infeccioso. Con el propósito de valorar el riesgo que comporta el trabajo con agentes infecciosos, tanto sea en un laboratorio como en un estabulario, se han establecido clasificaciones de riesgo biológico para los diferentes microorganismos. De este modo, los requerimientos mínimos necesarios o recomendables para la protección de las personas en

**TABLA II**  
**GRADOS DE PELIGROSIDAD DE LOS**  
**AGENTES INFECCIOSOS, EN FUNCIÓN**  
**DEL RIESGO QUE IMPLICA LA INFECCIÓN**  
**PARA EL SER HUMANO**

**Grado 1**

Resulta poco probable que cause una enfermedad en la especie humana

**Grado 2**

Puede causar enfermedad en la especie humana, y la exposición al mismo puede constituir un peligro, pero es poco probable que se extienda a la colectividad, y por lo general existe profilaxis y/o tratamiento eficaz

**Grado 3**

Puede causar enfermedad grave en la especie humana, y por tanto la exposición comporta un serio peligro para la salud. Existe riesgo de que se propague a la colectividad, si bien por lo general hay tratamiento y/o profilaxis eficaz

**Grado 4**

Puede causar enfermedad grave en la especie humana, y por tanto la exposición comporta un serio peligro para la salud. La probabilidad de que se propague en la colectividad es alta, no existiendo por lo general una profilaxis o un tratamiento eficaces

contacto, y que han de cumplir las instalaciones en las que se realiza el trabajo en cuestión, dependen del grado en que esté clasificado el agente infeccioso correspondiente. La normativa europea ha sido recogida en el Real Decreto 664/1997, que establece la peligrosidad de los agentes infecciosos y los grados de contención necesarios para el trabajo con los mismos. Este decreto establece una clasificación de los agentes infecciosos en cuatro niveles de riesgo, desde grado 1 a grado 4, de menor a mayor peligrosidad. Las características de los agentes incluidos en cada uno de los niveles de riesgo se resumen en la tabla II. Ha de tenerse en cuenta que esta clasificación se ha realizado considerando los posibles efectos de los agentes infecciosos sobre sujetos sanos y, por tanto, no se han tenido en cuenta características particulares de la persona, como enfermedades previas, medicación, trastornos inmunitarios, embarazo o lactancia. Las principales bacterias, virus, hongos, parásitos y priones que han de manipularse en contención

de nivel 3 se recogen en la tabla III. Como complemento de esta clasificación de peligrosidad de los agentes infecciosos, el Real Decreto 664/1997 regula además las principales características que han de cumplir las instalaciones que alberguen o manipulen agentes infecciosos (tabla IV). Los niveles de contención de la instalación, con valores progresivos de 1 a 4, se corresponden con los niveles de peligrosidad fijados para los microorganismos respectivos. El grado de protección adecuado de experimentadores y cuidadores, incluso en instalaciones diseñadas de forma óptima, sólo puede alcanzarse a través de procedimientos de trabajo correctos, específicos del trabajo con animales infectados. En la tabla V se incluyen algunas de las recomendaciones que afectan al personal en contacto con animales infectados.

El riesgo de contagio desde los animales infectados hacia las personas puede ser por contacto directo, a través de secreciones (en especial saliva, heces y orina), o por vía aerógena en aerosoles. A su vez, los traumatismos (mordeduras, arañazos), aparte de las lesiones en sí mismas, son vía de inoculación parenteral de agentes infecciosos. La diseminación de agentes infecciosos en aerosoles a partir de los animales infectados obliga a medidas de contención específicas en los alojamientos de animales. En el caso de animales de pequeño tamaño, la contención puede realizarse en aisladores herméticos, con sistemas de filtración absoluta a la salida del circuito. Sin embargo, en el caso de animales de tamaño mediano (p. ej., animales domésticos como el perro, el cerdo o la oveja), la contención sólo es posible desde el cubículo experimental hacia el exterior (sistemas de filtro a la salida del sistema de ventilación). En estos casos, el experimentador ha de protegerse individualmente (mascarillas, etc.) antes de penetrar en el cubículo. Es interesante señalar que algunos de los agentes infecciosos de peligrosidad 3 (tabla III) no se transmiten a través del aire. Este hecho simplifica enormemente la experimentación con estos agentes, pues si bien ésta tiene que seguir realizándose en instalaciones con nivel de contención 3, los animales y las muestras de ellos recogidas no tienen obligatoriamente que manejarse en cabinas de seguridad biológica, aisladores o sistemas similares.

**Requerimientos legales de la experimentación animal**

La protección de los seres vivos vertebrados utilizados con fines experimentales, científicos o

**TABLA III**  
**PRINCIPALES AGENTES INFECCIOSOS CLASIFICADOS EN EL NIVEL DE RIESGO 3, CON INDICACIÓN (\*) DE AQUELLOS CUYA TRANSMISIÓN NO SE REALIZA POR VÍA AERÓGENA**

<p><b>Bacterias</b></p> <p><i>Bacillus anthracis</i>  <i>Brucella abortus</i>  <i>Brucella canis</i>  <i>Brucella melitensis</i>  <i>Brucella suis</i>  <i>Chlamydia psittaci</i> (cepas aviares)  <i>Coxiella burnetii</i>  * <i>Escherichia coli</i> (cepas verocitotóxicas)  <i>Francisella tularensis</i> (tipo A)  <i>Mycobacterium africanum</i>  <i>Mycobacterium bovis</i>  * <i>Mycobacterium microti</i>  <i>Mycobacterium tuberculosis</i>  * <i>Mycobacterium ulcerans</i>  <i>Pseudomonas mallei</i>  <i>Pseudomonas pseudomallei</i>  * <i>Rickettsias</i>  * <i>Salmonella typhi</i>  * <i>Shigella dysenteriae</i> (tipo 1)  <i>Yersinia pestis</i></p> <p><b>Hongos</b></p> <p><i>Blastomyces dermatitidis</i>  <i>Coccidioides immitis</i>  <i>Histoplasma capsulatum</i>  <i>Paracoccidioides brasiliensis</i></p> <p><b>Virus</b></p> <p>Coriomeningitis linfocítica (cepas neurotrópicas)  * Hepatitis C</p>	<p>Encefalitis B japonesa  Fiebre amarilla  * Hepatitis B  * Hepatitis D  Herpesvirus <i>simiae</i> (virus B)  * Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)  * Virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS)  * Virus de la leucemia de células T (VLCT)  * Rabia  * Hepatitis E</p> <p><b>Parásitos</b></p> <p>* <i>Echinococcus granulosus</i>  * <i>Echinococcus multilocularis</i>  * <i>Leishmania brasiliensis</i>  * <i>Leishmania donovani</i>  * <i>Plasmodium falciparum</i>  * <i>Taenia solium</i>  * <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>  <i>Trypanosoma cruzi</i></p> <p>Encefalopatías espongiiformes transmisibles  * Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob  * Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker  * Encefalopatía espongiiforme bovina (EEB)  * Otras TSE de origen animal afines</p>
---	--

educativos está regulada en el ámbito del Consejo de Europa por el Convenio Europeo firmado en 1986 y en el marco de la Unión Europea por la Directiva 86/609/CEE. En el ámbito estatal se recoge la aplicación de estas normativas en el Real Decreto 223/1988 que, a su vez, establece las competencias de las distintas Comunidades Autónomas en la regulación y control de la experimentación animal. En Cataluña, el marco jurídico ya existente sobre protección animal (Ley 3/1988) se complementa con la legislación específica sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otras finalidades científicas: Ley 5/1995 y Decreto 214/1997. Así pues, la utilización de seres vivos vertebrados como modelos experimentales en patología infecciosa debe realizarse de acuerdo con lo establecido en esta legislación, en los distintos aspectos que a continuación se resumen:

*¿Cuándo se pueden desarrollar procedimientos que impliquen el uso de animales?*

Sólo en aquellos casos en los que no exista un procedimiento alternativo, factible y validado que permita obtener unos resultados equivalentes sin usar animales.

*¿Quién puede diseñar y realizar procedimientos experimentales con animales?*

Solamente aquellas personas debidamente acreditadas como personal investigador y experimentador, sobre la base de su nivel de formación y experiencia.

*¿Dónde se pueden llevar a cabo procedimientos experimentales con animales?*

Únicamente en centros debidamente registrados, lo que garantiza que disponen de instalaciones y personal adecuados para estos fines.



TABLA IV  
MEDIDAS DE CONTENCIÓN A OBSERVAR PARA LOS DIFERENTES GRADOS  
DE PELIGROSIDAD DE LOS AGENTES INFECCIOSOS

<i>Medidas de contención</i>	<i>Niveles de contención</i>		
	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
1. La zona de trabajo se encontrará separada de toda actividad que se desarrolle en el mismo edificio	No	Aconsejable	Sí
2. El aire introducido y extraído de la instalación se filtrará mediante filtros HEPA	No	Sí, para el aire de salida	Sí, para el aire de entrada y de salida
3. Acceso controlado de personal	Aconsejable	Sí	Sí, con exclusión de aire
4. La instalación deberá poder precintarse (por zonas o en su totalidad) para permitir su desinfección	No	Aconsejable	Sí
5. Procedimientos de desinfección especificados	Sí	Sí	Sí
6. La instalación se mantiene globalmente en presión negativa respecto a la presión atmosférica	No	Aconsejable	Sí
7. Control eficiente de vectores (p. ej., roedores e insectos)	Aconsejable	Sí	Sí
8. Superficies impermeables al agua y de fácil limpieza	Sí, para superficies de trabajo	Sí, para superficies de trabajo y suelos	Sí, para superficies de trabajo y suelos, paredes y techo
9. Superficies resistentes a ácidos, álcalis, disolventes y desinfectantes	Aconsejable	Sí	Sí
10. Almacenamiento de seguridad para agentes biológicos	Sí	Sí	Sí, almacenamiento seguro
11. Ventana o dispositivo de observación equivalente para visualizar a los ocupantes de las zonas de trabajo	Aconsejable	Aconsejable	Sí
12. Instalación con equipamiento propio	No	Aconsejable	Sí
13. El material infectado, incluidos los animales, deberá manejarse en cabinas de seguridad biológica o aisladores apropiados	Cuando proceda	Sí, para infecciones que se propaguen por el aire	Sí
14. Incinerador para la destrucción de cadáveres de animales	Aconsejable	Sí	Sí, en la misma instalación

TABLA V  
PROCEDIMIENTOS Y RELATIVOS AL  
PERSONAL EN ANIMALARIOS CON NIVEL  
DE BIOSEGURIDAD 3

---

Acceso a las salas de inoculación restringido o limitado a personal informado del riesgo de infección. No se permite el acceso a personas con mayor riesgo de infectarse
Colocación de signos de peligrosidad biológica bien visibles a la entrada de los habitáculos de animales en el caso de que se requiera equipo de protección accesorio (máscara, etc.), con la indicación respectiva
Lavado de manos al manipular animales, al quitarse los guantes, y al abandonar la instalación
Prohibición de comer, beber, y fumar, y de almacenar alimentos en los habitáculos de animales
Evitar la formación de aerosoles en cualquier manipulación
Descontaminación de las superficies de trabajo si se derrama material infeccioso
El personal sigue programas de vacunación apropiados, y se le practican pruebas de diagnóstico de forma rutinaria frente a las enfermedades a las que está expuesto. Así mismo, se recogen muestras de suero del personal, que se analizan y se conservan de forma histórica
Existe un manual de bioseguridad, puesto en conocimiento del personal, que recibe instrucción periódica y actualizaciones sobre procedimientos, al menos anualmente
Se adoptarán precauciones especiales al manipular instrumentos contaminados punzantes o cortantes (agujas, hojas de bisturí, etc.), que serán colocadas en contenedores especiales para ser autoclavados antes de su eliminación

---

*¿Cuál es el proceso a seguir para desarrollar un procedimiento experimental?*

El investigador ha de presentar un protocolo detallado del estudio, que debe ser previamente aprobado por el comité ético en experimentación animal del centro y notificado a la Administración. En determinados supuestos se requiere también la autorización previa de la Administración.

*¿Qué aspectos principales debe supervisar este comité ético?*

La idoneidad del procedimiento en función de los objetivos del estudio, la utilización del menor número posible de animales que permita obtener conclusiones válidas, la inexistencia de métodos alternativos a la utilización de animales, la idoneidad del modelo experimental seleccionado, el correcto tratamiento y cuidado de los animales, la aplicación de todas aquellas técnicas que permitan reducir o eliminar el sufrimiento, dolor y estrés de los animales, la utilización de métodos eutanásicos adecuados y humanitarios, la adecuada formación del personal que intervenga en el estudio y que el mismo se desarrolle de acuerdo con el protocolo aprobado.

## BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Anónimo. Classification of etiologic agents on the basis of hazard (4ª ed.). U.S. Public Health Service Ad Hoc Committee on the safe shipment and handling of etiologic agents. Washington DC: U.S. Department of Health Education and Welfare, 1974.
- Anónimo. Biological safety manual for research involving oncogenic viruses. National Cancer Institute. DHEW Pub. n° 76-1165. Washington DC: U.S. Department of Health Education and Welfare, 1976.
- Anónimo. Council Directive of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes (86/609/EEC). Anexo II al artículo 5, 1986.
- Anónimo. Biosafety in the laboratory: prudent practices for handling and disposal of infectious materials. Committee on hazardous biological substances in the laboratory. National Research Council. Washington DC: National Academy Press, 1989; 244.
- Anónimo. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories (3ª ed.). Centers for Disease Control and National Institutes of Health DHHS Pub. n° (CDC) 93-8395. Washington DC: U.S. Department of Health and Human Services, 1993; 177.
- Anónimo. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and National Institutes of Health (NIH). Biosafety in microbiological and biomedical laboratories (3ª ed.). HHS Pub. n° 93-8395. Washington DC: U.S. Government Printing Office, 1993.
- Anónimo. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and National Institutes of Health (NIH). Primary containment biohazards: selection, installation, and use of biological safety cabinets. Washington DC: U.S. Government Printing Office, 1995.
- Anónimo. Biosafety guidelines. Revised 1997 from of the University of Toronto, 1997. <http://duke.usask.ca/~whiterv/bioman6b.html>
- Barbeito MS et al. Recommended biocontainment features for research and diagnostic facilities where

- animal pathogens are used. Rev Sci Tech 1995; 14: 873-887.
- Block, Seymour S. Disinfection, sterilization and preservation (4ª ed.). Lea & Febiger, 1991.
- Heine, Willi OP. Umweltmanagement in der Labortierhaltung. Pabst Science Publishers, 1998.
- Federation of Animal Science Societies. Guide for the care and use of agricultural animals in research and teaching, 1999.
- McElvaine M et al. Defining and applying risk analysis: excerpts from the proceedings of the fourth national symposium on biosafety. Lab Animal 1997; 26: 22-25.
- Murray PK. An overview of the roles and structure of international high-security veterinary laboratories for infectious animal diseases. Rev Sci Tech Off Int Epiz 1998; 17: 426-443.
- National Institute of Health. Guide for the care and use of laboratory animals (6ª revisión). Washington DC: National Academy Press, 1996.
- NRC. Occupational health and safety in the care and use of laboratory animals. Washington: National Academy Press, 1997.
- Richardson JH et al. Biosafety guidelines—an annotation of animal biosafety level. Lab Animal 1996; 25: 32-35.
- Richmond JY et al. Working safety at animal biosafety levels 3 and 4: facility design and management implications. Lab Animal 1997; 26: 28-35.
- Seamer JH et al. Safety in the animal house (2ª ed.). En: Laboratory Animal Handbooks 5. Londres: Laboratory Animals Ltd., 1981.
- Simmons ML. Biohazards and zoonotic problems of primate procurement, quarantine and research. En: Cancer research safety monograph series. Vol. 2 DHEW. Pub. n° 76-890. Washington DC: U.S. Department of Health Education and Welfare, 1976; 137.
- Swiss Federal Act on Animal protection of March 9, 1978 (State as per July 1, 1995), <http://www.admin.ch/bvet>
- Swiss Animal Protection Ordinance of May 27, 1981 (State as per November 1, 1998), <http://www.admin.ch/bvet>
- Van Zutphen LFM et al. Principles of laboratory animal science. Elsevier Science Publishers B.V., 1993.
- Weinberg AN, Weber DJ. Animal-associated human infections. Infect Dis Clin North Am 1991; 5: 1-181.
- World Health Organization (WHO). Laboratory biosafety manual (2ª ed.). Ginebra: WHO, 1993.

## DISCUSIÓN

J.M. MIRÓ: La mayor parte de modelos experimentales que se han comentado hoy, con bacterias y hongos, se situarían en un nivel inferior al que has centrado tu presentación. Creo que sólo el modelo del grupo de Pere-Joan Cardona, con micobacterias, correspondería al nivel 3. ¿Podrías comentar brevemente las medidas correspondientes al nivel 2?

M. DOMINGO: En el nivel de contención 2 se requieren las medidas de un laboratorio convencional, es decir, se restringe un poco la entrada de personal, siendo aconsejable que haya un acceso controlado pero sin ser absolutamente obligatorio. Es lógico que si se trabaja con modelos infecciosos sería mucho más conveniente asegurar este acceso restringido. No se requiere aislamiento especial, no hace falta filtrar el aire de salida, ni poder precintar la instalación para posibles escapes de algún agente infeccioso y no se necesita tener presión negativa. La ventilación puede ser la habitual de un centro de investigación, con un sistema estándar de aire acondicionado. Las poyatas, lógicamente, deben tener las superficies tratadas para poder trabajar en ellas y poder desinfectarlas, pero no se requiere nada especial en suelos, paredes y techos.

J. GAVALDÀ: Por un lado me parece fantástico que la normativa no obligue a un nivel de seguridad

especial para los grupos que trabajamos con modelos de infección en animales, porque, a veces, nos encontramos con ciertas trabas para poder trabajar con una cierta "comodidad". Estamos convencidos que la mayoría de modelos experimentales de infección no comportan ningún riesgo para el resto de procedimientos, pero generalmente es difícil convencer a los otros investigadores. Finalmente, me gustaría comentar que el grado de seguridad dentro de un mismo nivel 2 variará en función del patógeno con el que se trabaje; por ejemplo, si trabajas con un modelo de endocarditis por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM), se deben tomar medidas de aislamiento de contacto porque uno puede convertirse en portador, al igual que si se trabaja con neumonía por neumococo altamente resistente.

M. DOMINGO: Respecto a la primera observación, si se está trabajando con un grupo de nivel 3, se debe trabajar lógicamente de forma independiente. Lo que es absurdo es obligar a que modelos que estén en nivel 2, deban entrar en una instalación de nivel 3, porque no tiene ninguna lógica y va a complicar de forma grave la manera de trabajar, además de crear cierto síndrome diario de resistencia de entrar en las instalaciones antes de empezar a trabajar. Cen-

trándonos en el nivel 2, convencer a las personas de alrededor de que un tipo de agente infeccioso no va a ser problemático para sus experimentos dependerá fundamentalmente de las barreras de contención que podamos argumentar y mostrar a la otra persona o grupo. De todas maneras, eso no siempre es fácil porque no todo el mundo entiende las dudas de una misma manera. El entendimiento siempre es más fácil, en mi opinión, entre investigadores que entre un grupo de investigación y la autoridad administrativa o la autoridad laboral. Lo mejor es aislar totalmente, no compatibilizar y evitar zonas comunes de trabajo para determinados procedimientos, siempre que ello sea posible. La normativa establece que se haga una valoración de riesgo en cada caso y que, fruto de esta valoración, se tomen las medidas más oportunas.

J. GAVALDÀ: Si centramos la discusión en el nivel 2, tú sugieres separar los diferentes procedimientos, ante lo cual yo no estoy nada de acuerdo. Es decir, si tenemos que rentabilizar nuestros espacios de estabulario y además queremos trabajar con comodidad y eficacia, lo ideal es disponer de espacio y evitar separaciones excesivas del animalario. Mi experiencia es que trabajar con endocarditis, osteomielitis, peritonitis, etc., no comporta ningún riesgo para grupos próximos que no trabajen con infecciones; sin embargo, siempre que se plantea el tema dentro de un mismo nivel 2, acaban obligándonos a separar el estabulario y el laboratorio, lo que al final conduce a espacios muy reducidos, con una incomodidad absoluta y sin ningún sentido.

M. DOMINGO: Tal vez las cosas podrían mejorar si este tipo de decisiones se acordaran de forma colegiada y con una discusión independiente a los dos grupos enfrentados por ese problema. La normativa considera la posible constitución de una comisión, dependiente de la empresa, que debe realizar este tipo de valoraciones de riesgo antes de tomarse medidas. En cualquier caso, aconsejo explicarlo a los respectivos directores de vuestros estabularios, que son en este momento los que pueden tomar decisiones sobre si podéis trabajar con vuestros modelos *dentro, al lado o fuera* de determinadas instalaciones.

J.L. RODRÍGUEZ TUDELA: Para el establecimiento del nivel de seguridad es importantísimo tener

en cuenta también cómo se transmite el microorganismo con el que se trabaja, si lo hace por aire o por otra vía. Las precauciones, por ejemplo, con *S. aureus*, deben ser muy diferentes que con otros microorganismos. Y, como se ha comentado, a pesar de la importancia que pueda tener la normativa, siempre debe prevalecer el sentido común. En los laboratorios de microbiología y de modelos de infección se manipulan grandes cultivos de microorganismos algunos de los cuales hay que considerar con otro nivel de seguridad; es el caso de *Legionella* o *Cryptococcus neoformans* que, por ejemplo, no son contemplados en el decreto.

J. CANTÓ: Creo que se debe abandonar la creencia de que los que trabajan con determinados modelos experimentales sean unos "apestados", aunque sea con modelos de patología infecciosa. La posible solución al problema que se ha planteado anteriormente y si no se quiere crear una comisión, sería el nombramiento, como establece la ley, de una persona responsable de estos temas para todo el centro. Así se evita la polémica y el enfrentamiento entre los propios grupos de investigación implicados. El responsable, basándose en criterios científicos y a través de la dirección del centro, será quien deba comunicar a los grupos cuáles tienen que utilizar un espacio, compartido o no con otros investigadores. De todas maneras y en determinadas situaciones, existen además problemas de falta de espacio para poder compartimentar los laboratorios. Esto puede ser independiente de que se trabaje con patología infecciosa o no, y la justificación reside en que determinados grupos de investigación agradecerían tener su pequeña zona de experimentación a fin de facilitar el control de los experimentos, no por el riesgo de infección, en este caso, sino por la conciencia de los miembros del grupo en evitar ruidos, lo que repercute en un menor estrés para los animales y se traduce en la obtención de mejores o más fiables resultados en los experimentos. A nivel sanitario la solución la brindan las cabinas o unidades autónomas de aislamiento, también conocidas como armarios, que permiten compartimentar una sala en 3 o 4 de pequeñas, sin hacer obras, y que ofrecen garantías, incluso, de filtración sanitaria, si es que es éste el riesgo, para que distintos grupos puedan compartir un mismo espacio.

---

# A modo de conclusión

---

Algunos comentarios que considero que cabría destacar de las diferentes presentaciones y discusiones de la mesa redonda de hoy, a modo de muy breve conclusión, son los siguientes:

– Se debe destacar la importancia del empleo de bioensayos o ensayos biológicos para determinar las concentraciones de antibióticos y la ventaja que esto puede tener para los antibióticos con metabolitos.

– Cada vez adquieren más importancia los modelos humanizados, con la compleja base matemática que requieren, a pesar de que todavía hace falta una demostración formal de su validez.

– En el modelo de endocarditis, incluso tratándose de uno de los modelos más clásicos, persisten todavía dudas y discusiones sobre cuándo se debe iniciar el tratamiento y sobre el momento más adecuado del sacrificio del animal.

– En el modelo de meningitis, por un lado cabe destacar la corroboración con los animales de los datos sobre el empleo de la dexametasona administrada previa o simultáneamente al tratamiento antibiótico, a partir de los datos ya publicados por el mismo grupo en patología humana; por otro lado, destaca que el empleo de antiinflamatorios no debe ser una práctica rutinaria dado que, por ejemplo, con vancomicina se ha observado que no funciona bien al menos en el modelo animal.

– En el modelo de neumonía se ha generado cierta discusión sobre la manera de inocular el neumococo, si por inhalación o depositando directamente los microorganismos en el tejido pulmonar.

– Una de las cosas que ha llamado más la atención en los modelos de infección por cuerpo extraño ha sido la capacidad de desarrollar resistencias reales de los microorganismos por el hecho de contactar con determinados cuerpos extraños, aparte de los problemas del *slime* o del glicocálix que puedan impedir el acceso físico del agente patógeno.

– También se ha comentado en una de las discusiones la inexistencia de diferencias demostradas para la mayoría de los modelos por emplear animales de uno u otro género. La recomendación ha sido emplear ambos géneros, lo que probablemente facilita el trabajo a los que se encargan de la cría.

– El estudio del componente inflamatorio a través de los modelos de infecciones intraabdominales adquiere cada vez más importancia, sobre todo en los modelos de cirugía laparoscópica. Al igual que ha sucedido con la meningitis, quizás en un futuro habrá que plantearse analizar la asociación de antiinflamatorios al tratamiento antibiótico; de hecho, ya existen datos en este sentido en peritonitis espontánea del cirrótico.

– En los modelos experimentales de infecciones fúngicas, lo más llamativo es que casi nada parece estar estandarizado y que queda mucho trabajo por delante en la estandarización tanto del propio modelo como de la forma de valorar los resultados.

– A pesar de todos los problemas comentados con el modelo de tuberculosis pulmonar, quizá lo importante es disponer del modelo como tal, y conseguir que sea reproducible. Con las modificaciones introducidas al modelo se constata que es muy parecido a la tuberculosis pulmonar del humano, lo que permite utilizarlo para el análisis de nuevos fármacos.

– El modelo de osteomielitis es el modelo clásico conocido por todos, aunque en la actualidad puede generar algunas discusiones en cuanto a su definición.

– Finalmente, en la última intervención de hoy, se han presentado las bases de cómo organizar los niveles de seguridad o de aislamiento de los laboratorios que trabajan con modelos experimentales de patología infecciosa.

**José M.<sup>a</sup> Gatell**

Servicio de Enfermedades Infecciosas.  
IDIBAPS\* -Hospital Clínic Universitari de Barcelona.  
Correo electrónico: gatell@medicina.ub.es

---

\*IDIPAPS = Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer.

---

# CENTROS CON MODELOS EXPERIMENTALES DE PATOLOGÍA INFECCIOSA QUE HAN PARTICIPADO EN ESTA MONOGRAFÍA

---

<i>Centro</i>	<i>Responsables</i>	<i>Modelos experimentales</i>
<p><b>Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III</b></p> <p>Unidad de Micología Ctra. Majadahonda-Pozuelo km. 2 28220 Majadahonda</p>	<p>J.L. Rodríguez-Tudela, M. Cuenca-Estrella, E. Mellado Tel. 91-509-79-61 Fax: 91-509-79-66 juani.rodriguez-tudela@isciit.es</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Candidosis diseminada</li> <li>• Aspergilosis invasora</li> </ul>
<p><b>Ciutat Sanitària Universitària de Bellvitge</b></p> <p>Servicio de Enfermedades Infecciosas Laboratorio de Infección Experimental Pavelló de Govern. Lab. 4131 Feixa Llarga, s/n 08907 L'Hospitalet de Llobregat</p>	<p>C. Cabellos, F. Gudiol, J.M. Maiques, P.F. Viladrich, A. Montero, X. Ariza Tel. 93-403-58-03 Fax: 93-260-76-37 ccabellos@csb.scs.es fgudiol@csb.scs.es</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meningitis neumocócica en conejos</li> <li>• Meningitis por <i>P. aeruginosa</i> en cobayas</li> <li>• Neumonía por <i>A. baumannii</i> en ratones</li> </ul>
<p><b>Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid</b></p> <p>Departamento de Microbiología I 28040 Madrid</p>	<p>J. Prieto, M.L. Gómez-Lus, F. Fuentes Tel. y fax: 91-394-15-11 jprieto@eucmax.sim.ucm.es</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neumonía en ratones</li> <li>• Sepsis intraperitoneal en ratones</li> <li>• Lesión en muslo de ratón neutropénico</li> </ul>
<p><b>IDIBAPS-Hospital Clínic Universitari de Barcelona</b></p> <p>Villarroel, 170 08036 Barcelona</p> <p>Laboratorio Experimental de Cirugía General (Escalera 6, 1.ª planta)</p>	<p>M.C. Balagué Tel. 93-227-55-89 cbalagué@sendanet.es</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alteraciones estructurales del peritoneo diafragmático según diferencias de presión intraabdominal. Influencia sobre la absorción translinfática en presencia de peritonitis</li> </ul>

(Continúa)

**RELACION DE LOS CENTROS Y RESPONSABLES CON MODELOS EXPERIMENTALES DE PATOLOGÍA INFECCIOSA QUE HAN PARTICIPADO EN ESTA MONOGRAFÍA (Cont.)**

<i>Centro</i>	<i>Responsables</i>	<i>Modelos experimentales</i>
Laboratorio Experimental de Enfermedades Infecciosas y Microbiología (Escalera 9, 4.ª planta)	J.M. Miró, F. Marco, J.M. Gatell, M.T. Jiménez de Anta Tel. 93-227-55-86 Fax: 93-451-44-38 miro@medicina.ub.es marco@medicina.ub.es	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endocarditis infecciosa: modelos de profilaxis y tratamiento</li> <li>• Farmacocinética humanizada</li> </ul>
<b>Hospital de la Santa Creu i de Sant Pau</b> Servicio de Cirugía General Laboratorio de Inflamación Pare Claret, 167 08025 Barcelona	E.M. Targarona, J. Vila, M. Trias Tel. 93-291-91-47 Fax 93-292-92-29 13882ets@comb.es 7666@hsp.santpau.es	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mecanismos precoces de respuesta peritoneal por contaminación intraoperatoria experimental durante la cirugía laparoscópica comparada con la cirugía abierta</li> </ul>
<b>Hospital de la Vall d'Hebron</b> Servei de Malalties Infeccioses Laboratori de Recerca en Malalties Infeccioses Pg. Vall d'Hebron, 119-129 08035 Barcelona	A. Pahissa, J. Gavalda, J.A. Capdevila, P. López Tel. 93-489-40-33 Fax: 93-274-60-57 pahissa@hg.vhebron.es gavalda@hg.vhebron.es janton@hg.vhebron.es	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endocarditis</li> <li>• Neumonía</li> <li>• Sepsis por catéter</li> <li>• Peritonitis</li> <li>• Aspergilosis pulmonar invasiva</li> <li>• Farmacocinética humanizada</li> </ul>
<b>Hospital Gómez Ulla</b> Unidad de Enfermedades Infecciosas Crta. Ejército, s/n 28047 Madrid	M. Gomis, J. Barberán Tel. 91-422-80-00 Fax: 91-422-82-01 mgomis@iponet.es msantos@sefh.es	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Osteomielitis crónica</li> </ul>
<b>Hospital Universitari Germans Trias i Pujol</b> Unitat de Tuberculosis Experimental Carretera del Canyet, s/n 08916 Badalona	P.J. Cardona, V. Ausina Tel. 93-497-88-95 Fax: 93-497-88-94 pcardona@ns.hugtip.scs.es	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tuberculosis experimental</li> </ul>
<b>Hospitales Universitarios Virgen del Rocío</b> Laboratorio de Modelos Experimentales Servicio de Enfermedades Infecciosas Avda. Manuel Siurot, s/n 41013 Sevilla	J. Pachón Pichardo, A. García Curiel Tel. 95-424-82-65 Fax: 95-424-81-84 jpachon@hvr.sas.cica.es	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endocarditis infecciosa</li> <li>• Neumonía en ratones y cobayas</li> </ul>

IDIBAPS: Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer.

---

# Índice de materias

---

- Absceso intraabdominal, 107,109,112
- Actividad *in vitro*, 12
- Animales de laboratorio, 170,166-168
- Aspergilosis pulmonar, 125-129
- Candidiasis sistémica experimental, 120-125
- Cuerpo extraño, 92
- Curva de letalidad, 15
- Efecto postantibiótico, 27, 28
- Endocarditis experimental, 48, 51
  - profilaxis, 51-52
  - tratamiento, 52-58
- Farmacocinética, 29, 33
- Farmacocinética animal, 38, 39
  - humana, 37
  - humanizada, 36, 40-43
- Farmacodinamia, 24, 25, 33
- Fisiopatología de la neumonía, 85-86
- Gnotobiología, 163
- Infecciones intraabdominales, modelo experimental, 105-109
- Infecciones por cuerpos extraños, modelo experimental, 92-95
  - profilaxis, 93
- Meningitis experimental, 72-75
  - patología, 75-76
  - tratamiento, 76-77
- Neumonía, modelo experimental, 82-85
  - tratamiento, 86-87
- Osteomielitis crónica, 154-157
  - experimental, 149-151
  - patología, 152, 154
- Patogenia fúngica, 125, 128
- Recomendaciones de seguridad, 172
- Shock séptico, modelo experimental, 105, 112
- Sinergia, 17, 18
- Tuberculosis experimental, 138-140
  - fisiopatología, 136, 140-143
  - tratamiento, 143-145



---

# Monografías Dr. Antonio Esteve publicadas

---

1. El hospital de día y su repercusión en terapéutica (1985).
2. Problemas que se plantean en el tratamiento de infecciones graves por *S. aureus* (1986).
3. Contribución del biólogo a la farmacología en España (1987).
4. Un glosario para farmacólogos (1987).
5. Aspectos biológicos de los síndromes depresivos (1988).
6. Bases del tratamiento de las intoxicaciones agudas (1988).
7. Investigación básica y medicina clínica (1988).
8. Tratamiento de datos en farmacología (1989).
9. Perspectivas terapéuticas en la esclerosis múltiple (1989).
10. Biotecnología de aplicación farmacéutica (1991).
11. Metodología del ensayo clínico (1991).
12. Periodismo científico. Un simposio internacional (1991).
13. El ensayo clínico como tarea cooperativa (1992).
14. Terapéutica y calidad de vida (1993).
15. Investigación sobre cáncer en España: de la biología molecular a la clínica (1994).
16. El tratamiento del dolor: del laboratorio a la clínica (1994).
17. Farmacología de los canales iónicos (1995).
18. Bases de datos en farmacología y terapéutica (1996).
19. Fármacos y conducción de vehículos (1996).
20. Traducción y lenguaje en medicina (1997).
21. Medicina y medios de comunicación. Traducción al español de una serie publicada en la revista *The Lancet* (1997).
22. Problemas y controversias en torno al ensayo clínico (1998).
23. Glosario de investigación clínica y epidemiológica (1998).
24. Transducción de señales como diana farmacológica (1999).
25. Investigación médico-farmacéutica en atención primaria. Una visión a través de las publicaciones de la REAP (1999).