Modelo de meningitis

Carmen Cabellos[a,*], Jerónimo Pachón[b] y Benito Almirante[c]

[a]Servicio de Enfermedades Infecciosas. Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge. L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona.
[b]Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Virgen del Rocío. Sevilla.
[c]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 estereoataxia, 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 estereoataxia. 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 standarized have been used, specially the rabbit model of pneumococcal menigitis 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 acrilic helmet is afixed to the calvarium. This metalic piece is needed to fix the rabbits to the stereoataxic frame. Twenty-four hours later the animals are anesthethized again and fixed to the stereoataxic frame. A spinal needle is introduced to the cisterna magna and *S. pneumoniae* or other microorganism or substances are inoculated into the subaracnoidal space. Eighteen hours later the animals are anesthethized again with urethane and phenobarbital and placed again in the frame. A intravenous catheter is instaured 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[1]. 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[2], lavado subaracnoideo con agentes antisépticos[3] 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[4]. Otras vías que se intentaron fueron intranasal[5], intragástrica, intraperitoneal, intrasinusal, intraorbitaria, 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[6] y posteriormente 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[7]. 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 estereoataxia. 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 estereoataxia 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 μl 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 μl 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 estereoataxia 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 aletas (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 estabulación 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 diseca 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[8]. 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 positivización 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*[9]. Otros modelos que se desarrollaron en su día pero que no se han impuesto incluyen un modelo de meningitis por *H. influenzae* en primates[10], un modelo de meningitis neumocócica en conejos que utiliza la vía hematógena[11], 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 hematógena 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 fístula de LCR o de otitis o sinusitis aguda, pero no la que se produce por siembra hematógena 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[12], contribuyeron a los conocimientos previos para el desarrollo de la vacuna[13] y establecieron el papel del complemento en el enfermedad invasiva[14]. El modelo de meningitis neumocócica en conejos con inoculación intravenosa se ha utilizado para estudiar los cambios hemodinámicos que genera la enfermedad[15] y para describir con detalle la inflamación en el espacio subaracnoideo[16]. 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[17], la penetración de antibióticos en el LCR[18] 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[19,20], 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[21]. Se ha demostrado que esta endotoxina genera las alteraciones citoquímicas el 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 1β[22,23], los metabolitos del ácido araquidónico, el factor activador de las plaquetas[24], otras interleucinas, proteínas inflamatorias del macrófago (MIP 1 y MIP 2), prostaglandinas, etc.[25]. 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[26]. 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[27]. 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 desencadenar 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*[28,29]. 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[30]. 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)[31].

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[32]. 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[33], glucopéptidos con rifampicina[34], estudios de combinaciones de betalactámicos y glucopéptidos, especialmente ceftriaxona y vancomicina[33], betalactámicos (ceftriaxona, cefotaxima, amoxicilina o cefpiroma[35,36] y rifampicina), betalactámicos con fosfomicina[35,36], evaluación de nuevos glucopéptidos con y sin ceftriaxona[37,38], 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[39].

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[40,41].

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, Wegeforth P. Experimental irrigation of the subaracnoid space. J Pharmacol 1919; 13: 317-334.
4. Amoss HI, Eberson 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 Phyliol (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. Mc Cracken 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 meningtis 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. Corrall CJ, Winkelstein JA, Moxon ER. Participation of complement in hosat defense agaisnt encapsulated *Haemophilus influenzae*types a, c and d. Infect Immun 1982; 35: 759-763.
15. Sears MR, O'Donohue 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. Mc Allister 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. Animicrob 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 cel- wall 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 lipooligosacharide 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-Lorens X, McCracken GH. Role of interleukin-1β 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 meningits. 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 *Streptococus 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 vancoycin-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 amoxycillin and cefpirome 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-resisitant pneumocccal 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 pneumocccal 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 inocula 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, trovafloxacino, gemifloxacino, etc., para el tratamiento de la meningitis?

C. Cabellos: Se dispone de datos sobre clinafloxacino con este mismo modelo y funcionó muy bien. Estamos corroborando actualmente estos datos con clinafloxacino 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. Gavaldà: 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 seudomembranosa 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.