Modelo de neumonía

Jerónimo Pachón[a,*], Joan Gavaldà[b] y Josep Maria Miró[c]

[a]Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospitales Universitarios Virgen del Rocío. Sevilla. [b]Servei de Malalties Infeccioses. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona. [c]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 pharmacodinamic 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[1]. Este modelo se ha empleado para estudios sobre patogenia de la neumonía[2], la farmacocinética de los antimicrobianos en el pulmón, y para estudiar la eficacia de distintos antimicrobianos en neumonías producidas por distintos agentes[3]. 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*[3], *Klebsiella pneumoniae*[4], *Legionella pneumophila*[5] y *Haemophilus influenzae*[6].

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[7]. 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[8,9]. 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[1,10].

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 %[10] 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 Esposito y Pennington[6,7], utilizando ratones inmunocompetentes C57BL/6, hembras, con peso de 14-16 g. Los animales se anestesian con 15 μl 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 μl 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 10^8 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 μl 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[11].

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 comenzarlo 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 µl 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 intracardíaca 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 un 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 analizan 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 los 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[12]. Estos modelos fueron descritos originalmente en ratas por Cash et al[13], 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 durante 21 días[14]. De igual manera, se ha descrito un modelo en ratas de infección pulmonar crónica por *H. influenzae*[12], 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)[15]. 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[16].

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[17]. 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[18]. 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[18]. 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[19]. 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[20]. 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[21]. 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[22]. 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[11].

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[9]. 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[23]. 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[24].

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 proinflammatorias y antiinflammatorias, 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[25]. 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 immunoadyuvantes 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[26]. 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[27].

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[28], con el efecto *shunt* consiguiente.

El modelo de infección crónica pulmonar por *P. aeruginosa*[13,14] 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[15]. 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[12].

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[6]. 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[29,30], así como la de ketólidos en desarrollo inicial[31].

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 combinación[32] o un efecto indiferente[33]. La adición de aerosoles de tobramicina a su administración intramuscular aumentó la erradicación bacteriológica y disminuyó los fenómenos inflamatorios en cobayas[34]. 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[35], y en el modelo agudo en cobayas se observó la eficacia de imipenem y tobramicina[36]. 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*[37].

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[38], de amoxicilina a altas dosis frente a cepas con CMI de hasta 4 μg/ml[39], aumentándose la eficacia de amoxicilina al asociar ácido clavulánico[40]. 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)[41], 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[42]. 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[43,44]. 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[45]. 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[46]. 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[47]. 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[38], y la vancomicina en ratas inmunocompetentes[42].

BIBLIOGRAFÍA

1. Nungester WJ, Jourdonais LF. Mucin as an aid in the experimental production of lobar pneumonia. J Infect Dis 1936; 59: 258-265.
2. 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.
3. 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.
4. Nishi T, Tsuchiya K. Therapeutics effects of cefotiam and cefazolin on experimental pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1980; 18: 549-556.
5. 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.
6. Esposito AL, Pennington JE. Experimental pneumonia due to *Haemophilus influenzae*: observations on pathogenesis and treatment. J Infect Dis 1984; 149: 728-734.
7. Esposito AL, Pennington JE. Effects of aging on antibacterial mechanisms in experimental pneumonia. Am Rev Respir Dis 1983; 128: 662-667.
8. 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.
9. 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.
10. 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*. Berlín: 9th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 21-24 de marzo de 1999; 335.
11. 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 typo 2 pneumococcus. J Infect Dis 1995; 172: 119-123.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Slater LN. A rat model of prolonged pulmonary infection due to nontypable *Haemophilus influenzae*. Am Rev Respir Dis 1990; 142: 1.429-1.435.
16. 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.
17. Zak O. Scope and limitations of experimental chemotherapy. Experientia 1980; 36: 479-483.
18. Wilson R, Rayner C. Animals models of respiratory infections. J Antimicrob Chemother 1994; 33: 381-383.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. Vial WC, Toews GB, Pierce AK. Early pulmonary granulocyte recruitment in response to *Streptococcus pneumoniae*. Am Rev Respir Dis 1984; 129: 87-91.
24. Guckian JC, Christensen GD, Fine DP. The role of opsonins in recovery from experimental pneumococcal pneumonia. J Infect Dis 1980; 142: 175-190.
25. Moore TA, Standiford TJ. The role of cytokines in bacterial pneumonia: an inflammatory balancing act. Proc Assoc Am Physicians 1998; 110: 297-305.
26. 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.
27. 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, Pocidalo JJ, Walker F, Carbon C. Use of a new mouse model of *Acinetobacter baumannii* pneumonia to evaluate the postantibiotic 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 penicilin-cephalosporin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* in a mouse pneumonia model. Clin Microbiol Infect 1997; 3: 608-615.
42. Gavaldà 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 againsnt highly penicilii-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 reproducir 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 intraperitoneales 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. Pahissa: 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.