

UNIVERSITAT DE BARCELONA  
Facultat de Medicina  
Departament de Ciències Clíniques

ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA EFICACIA DE LOS  
GLUCOPÉPTIDOS EN MONOTERAPIA O CON  $\beta$ -LACTÁMICOS  
EN LA INFECCIÓN POR *Staphylococcus aureus* CON  
SENSIBILIDAD DISMINUIDA A GLUCOPÉPTIDOS

Memoria presentada por  
ALEJANDRO DOMENECH ARIZA  
para optar al grado de Doctor en Bioquímica

Barcelona, Marzo de 2006



La **Dra. M. Carmen Cabellos Mínguez**, médico adjunto del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitari de Bellvitge y el **Dr. Francesc Gudiol Munté**, Catedrático de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona hacen constar que la tesis doctoral titulada

**“Estudio experimental de la eficacia de los glucopéptidos en monoterapia o con  $\beta$ -lactámicos en la infección por *Staphylococcus aureus* con sensibilidad disminuida a glucopéptidos”**

que presenta el licenciado **Alejandro Doménech Ariza** ha sido realizada bajo su dirección en la Facultad de Medicina del Hospital Universitario de Bellvitge, la consideran finalizada y autorizan su presentación para que sea defendida ante el tribunal que corresponda.

En Barcelona, a 31 de Marzo de 2006

**Dra. M. Carmen Cabellos Mínguez**

**Dr. Francesc Gudiol Munté**



*A Eva*



*“¡Ah! ¡Cuán cruel es el intervalo que separa la concepción de un gran proyecto de su ejecución! ¡Cuántos vanos terrores! ¡Cuántas irresoluciones! Se trata de la vida - ¡No! Se trata de algo más: ¡del honor!”*

*Friedrich Schiller*





## AGRADECIMIENTOS

*A la Dra. M. Carmen Cabellos, directora de esta tesis, por su apoyo, implicación y dedicación durante todos estos años. En especial quiero agradecerle su confianza en los primeros tiempos y su esfuerzo por ser un puente, tanto en lo científico como en lo personal, entre el Hospital y el Laboratorio.*

*Al Dr. Francesc Gudiol, co-director de esta tesis, por su contribución a este trabajo, en los artículos y en el manuscrito: sus conocimientos y su experiencia han sido muy valiosos. Por apostar por la investigación experimental desde la clínica.*

*Al Dr. Javier Ariza, por muchas razones. Por ser maestro y cómplice. Por transmitir con pasión su conocimiento, por contagiar la inquietud. Por su compromiso vital con la ciencia y la medicina, por el rigor incansable y la crítica motivadora. Por la precisión de la frase, por la ironía oxigenante por no desfallecer ante revisiones imposibles. Por su confianza, su implicación generosa y su supervisión decisiva. Por manejar el vínculo con sutilidad... Su papel en esta tesis ha sido esencial, desde el concepto hasta el estilo. Su influencia y ejemplo han sido para mí un estímulo durante estos años y la huella, profunda.*

*A mis compañeros del laboratorio. A la "quasi-doctora" Sandra Ribes, por los muchos años que hemos compartido entre poyatas, animales, divagaciones científicas, confesiones y mutuo consuelo. Por ser la socia principal en este proyecto. Creo que los dos nos acordaremos siempre de estos años. Et desitjo el millor en el teu viatge...*

*A Ferran, porque él también pinchó ratones y después, entre charla y charla sobre el mundo, muchos conejos. Ara és la teva hora i, encara que des de la distància, tens el meu suport!*

*A Oscar, infectólogo clínico y experimental a partes iguales. Por haber compartido un proyecto apasionante y ambicioso que empieza a dar sus frutos... ¡siento no poder disfrutarlo hasta el final! Por la complicidad fraguada con el tiempo, desde la inquietud y la admiración. Ànims amb la segona meitat de TC que queden!*

*A mis primeros compañeros en el laboratorio. A Antonio Fernández por acogerme al principio y enseñarme el a, b, c. A Joe Maiques, por todas las noches de cobayas que compartimos, por tratarme como un hermano y responder con docente placer a todas mis preguntas sobre medicina. Fueron grandes aquellos días riníticos. A Abelardo Montero, por los viajes a Bellaterra y los percebes de Santiago, por trazar el camino y ser ejemplo de método y constancia... al final parece que hemos llegado!*

*A las doctoras Fina Liñares, M. Ángeles Domínguez y Fe Tubau, del Servicio de Microbiología del Hospital. Por su amabilidad y su disposición. A Fe, por encontrar siempre un hueco en su colmada agenda y hacerlo todo fácil. A M. Ángeles, por sus enseñanzas sobre el estafilococo y su conversación siempre amable. A Fina, por el interés que siempre ha mostrado por nuestro trabajo.*

*A los médicos del Servicio de Enfermedades Infecciosas con los que he coincidido, en especial a los doctores Pedro Fernández Viladrich, Miquel Pujol y Carmen Peña. Siempre ha sido un placer tratar con ellos.*

*Al personal del estabulario del Campus de Bellvitge de la Universidad de Barcelona: Álvaro, Pilar, Natacha y Pedro; en especial a Pilar, por su colaboración desinteresada y por ser cómplice en todo momento.*

*A mis amigos y compañeros de estudios Horacio Moreno y Josep M<sup>e</sup> Vilà. Su ejemplo me animó a tomar este camino. A Pep, por llegar hasta aquí, por disfrutar de los pequeños detalles, por su sutil sentido del humor. A Horacio, por tantos momentos compartidos, de Alemania al "Daxa", por las largas conversaciones, por tantas inquietudes...*

*A Nacho y Xavi, junto a los que he crecido y sin los que no sería hoy el mismo. A Edu, que ha estado tan cerca estos años, por su inquietud desbordante y su sensibilidad, por buscar la autenticidad con el corazón.*

*A toda mi familia y especialmente a mi madre, cuya lección de amor, fuerza y coraje nos ha marcado a todos. La suya ha sido una clase magistral.*

*A Eva, por haber dado un sentido especial a mi vida. Por todos los años apasionantes que nos esperan.*

Esta tesis se ha realizado con el apoyo de las becas de la

**Fundació August Pi i Sunyer** (año 2000-2001)

y la

**Universitat de Barcelona**

(becas de colaboración 23/2001 y 10/2003).

Los estudios han sido financiados por el

**Fondo de Investigaciones Sanitarias**

**Ministerio de Sanidad**

beca FIS 00/0156



# PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Parte de los resultados que se exponen en esta tesis doctoral han sido previamente publicados en revistas científicas y/o comunicados en congresos

## Publicaciones en revistas indexadas

1. **Domenech A.**, Ribes S., Cabellos C., Dominguez MA, Montero A., Linares J., Ariza J., Gudiol F. "A mouse peritonitis model for the study of glycopeptide efficacy in GISA infections." Microbial Drug Resistance 2004; 10:346-53.
2. **Domenech A.**, Ribes S., Cabellos C., Taberner F., Tubau F., Dominguez MA, Montero A., Linares J., Ariza J., Gudiol F. "Experimental study on the efficacy of combinations of glycopeptides and beta-lactams against *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides." Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2005; 56:709-16.

## Comunicaciones en congresos

1. **Domenech A.**, Ribes S., Cabellos C., Domínguez MA., Montero A., Liñares J., Ariza J., Gudiol F. "Standardization of a mouse peritonitis model of glycopeptide intermediate *Staphylococcus aureus* (GISA) infection." 11<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Istanbul, Turkey, April 2001.
2. **Domenech A.**, Ribes S., Cabellos C., Domínguez MA., Montero A., Liñares J., Ariza J., Gudiol F. "Experimental Study of the Efficacy of Combinations of Glycopeptides (GP) and beta-lactams (BL) in the Therapy of *Staphylococcus aureus* Peritoneal Infection." 41st Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, December 2001.
3. **Domenech**, S. Ribes, C. Cabellos, MA Dominguez, A. Montero, J. Liñares, J. Ariza, F. Gudiol. "Eficacia de la combinación de glicopéptidos y beta-lactámicos en un modelo de peritonitis experimental por GISA." X Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Sevilla, Marzo 2002.
4. **Domenech A.**, Tubau F., Cabellos C., Ribes S., Dominguez M.A., Liñares J., Ariza J. and F. Gudiol. "In vitro study of combination of glycopeptides and  $\beta$ -lactams against four different *Staphylococcus aureus* strains". 43st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, September 2003.



## **ÍNDICE**





---

# ÍNDICE

<i>Abreviaturas</i> .....	19
<b>Actualidad del tema y justificación del estudio</b> .....	21
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	23
1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> : CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS.....	25
1.2. PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD ESTAFILOCÓCICA.....	26
1.3. EPIDEMIOLOGÍA DE <i>S. aureus</i> .....	28
1.4. AGENTES ANTIESTAFILOCÓCICOS: GLUCOPÉPTIDOS .....	31
1.4.1. Historia y principales características .....	31
1.4.2. Estructura .....	32
1.4.3. Mecanismo de acción.....	32
1.4.4. Resistencia a glucopéptidos: mecanismo de <i>S. aureus</i> .....	33
1.4.5. Farmacocinética: eficacia <i>vs</i> toxicidad.....	35
1.4.6. Características farmacodinámicas y dosificación .....	38
1.5. EVOLUCIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE <i>S. aureus</i> .....	39
1.5.1. Perspectiva histórica .....	39
1.5.2. Heterogeneidad y resistencia intermedia: hGISA y GISA .....	41
1.5.2.1. Definición, características y significación clínica.....	41
1.5.2.2. Implicaciones en el tratamiento y alternativas .....	45
1.6. MODELOS ANIMALES DE INFECCIÓN EXPERIMENTAL .....	46
1.6.1. Importancia y aplicaciones .....	46
1.6.2. Principales modelos. Modelo de peritonitis en ratón .....	47
<b>2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS</b> .....	51
2.1. OBJETIVOS CONCRETOS.....	55
<b>3. DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	57
3.1. CEPAS DE ESTUDIO .....	59
3.2. EXPERIMENTOS <i>in vitro</i> : CURVAS DE LETALIDAD .....	60
3.3. ESTUDIOS <i>in vivo</i> : MODELO DE PERITONITIS Y ESTUDIOS DE EFICACIA .....	61
3.3.1. Modelo de peritonitis por <i>S. aureus</i> en el ratón.....	61
3.3.2. Obtención y procesamiento de muestras.....	63
3.3.3. Estudio farmacocinético y cálculo de parámetros PK/PD .....	64
3.3.4. Determinación de la concentración de antibiótico .....	66
3.3.5. Experimentos terapéuticos: protocolo final y pautas antibióticas.....	67
3.3.6. Análisis farmacodinámico.....	68
3.3.7. Estadística.....	70

---

<b>4. RESULTADOS (por objetivos y trabajos publicados)</b> .....	71
<b>4.1. OBJETIVOS PRIMERO Y SEGUNDO</b> .....	73
<b>4.2. OBJETIVOS TERCERO Y CUARTO</b> .....	85
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	95
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	109
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	113

---

## ABREVIATURAS

<b>MRSA (=SARM):</b>	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (resistente a meticilina)
<b>MSSA (=SASM):</b>	Methicillin susceptible <i>Staphylococcus aureus</i> (sensible meticilina)
<b>VS-</b>	Vancomycin sensitive (sensible a vancomicina)
<b>CA-MRSA:</b>	Community-acquired MRSA (de adquisición comunitaria)
<b>NA-MRSA:</b>	Nosocomial-acquired MRSA (de adquisición nosocomial)
<b>VISA/GISA:</b>	Glycopeptide/Vancomycin intermediate-resistant <i>S. aureus</i> (con resistencia <u>intermedia</u> a vancomicina/gluco péptidos)
<b>hVISA/hGISA:</b>	<i>S. aureus</i> heterogeneously resistant to vancomycin/glycopeptides (con resistencia heterogénea a vancomicina/gluco péptidos)
<b>VRSA/GRSA:</b>	Vancomycin/Glycopeptide-resistant <i>S. aureus</i> (resistente a V/GP)
<b>CMI:</b>	Concentración mínima inhibitoria (en inglés, MIC)
<b>AUC (=ABC):</b>	Area under the concentration-time curve (área bajo la curva)
$t_{1/2}$ :	Vida media
$C_{\text{máx}}$ o $C_{\text{min}}$	Pico o valle sérico
<b>LP:</b>	Líquido peritoneal.
<b>UFC:</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>TSA:</b>	Tripticase soy agar (agar de tripticasa-soja)
<b>TSB:</b>	Tripticase soy broth (caldo de tripticasa-soja)
<b>SF:</b>	Suero fisiológico
<b>PK/PD:</b>	Pharmacokinetic/pharmacodynamic (farmacocinético/-dinámico)
<b>PDI:</b>	Pharmacodynamic index (índice farmacodinámico)
<b>VAN:</b>	Vancomicina
<b>TEI:</b>	Teicoplanina
<b>CLO:</b>	Cloxacilina
<b>CTX:</b>	Cefotaxima
<b>UCI:</b>	Unidad de cuidados intensivos
<b>PG:</b>	Peptidoglucano
<b>PC:</b>	Pared celular
<b>PBP:</b>	Penicillin-binding protein (proteína fijadora de penicilina)



---

## ACTUALIDAD DEL TEMA Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El impacto de las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* no ha disminuido a lo largo de la historia a pesar del avance que ha supuesto, tanto el conocimiento del microorganismo y la fisiopatología de las enfermedades que produce, como el desarrollo de un gran arsenal terapéutico antibacteriano. *S. aureus* no es sólo uno de los patógenos más frecuentes como causa de infección tanto en el ámbito hospitalario como en la comunidad, sino que, a día de hoy, el tratamiento de la infección estafilocócica es un problema creciente.

Es conocida la gran capacidad de *Staphylococcus aureus* para desarrollar mecanismos de resistencia frente a los distintos grupos de antibióticos utilizados para el tratamiento de sus infecciones. En la década de los 80, se describieron numerosos brotes nosocomiales causados por cepas de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*), que hoy llegan a representar en algunas UCIs alrededor del 60% de las infecciones causadas por *S. aureus*. Las cepas de MRSA suelen presentar, además, resistencia asociada a otros grupos de antibióticos tales como macrólidos, quinolonas, aminoglicósidos, rifamicinas, tetraciclinas, etc. Este hecho convierte a los glucopéptidos en el tratamiento de elección en estas infecciones. Sin embargo, los glucopéptidos nunca han mostrado el mismo grado de eficacia y seguridad frente a MRSA que los  $\beta$ -lactámicos en el tratamiento de las infecciones causadas por *S. aureus* sensibles a meticilina, hecho que refleja lo crítico del tratamiento de estas infecciones.

Con la publicación en Japón en 1997 de un caso de fracaso terapéutico con vancomicina en una infección causada por una cepa MRSA con CMI a vancomicina de 8  $\mu\text{g/ml}$  (considerada resistencia intermedia) se creó una gran alarma en la comunidad internacional. Posteriormente, se comunicaron tres casos más en Estados Unidos y uno en Francia. Todos los pacientes habían recibido un tratamiento prolongado con vancomicina que no fue efectivo, y en el curso del cual se observó un incremento de la CMI de 2 a 8  $\mu\text{g/ml}$ . Hasta hoy se han descrito unos 25 casos de infecciones por cepas de *S. aureus* con resistencia intermedia a vancomicina (VISA o GISA, vancomycin- o glycopeptide-intermediate *S. aureus*). Además de estos casos, y quizás como un

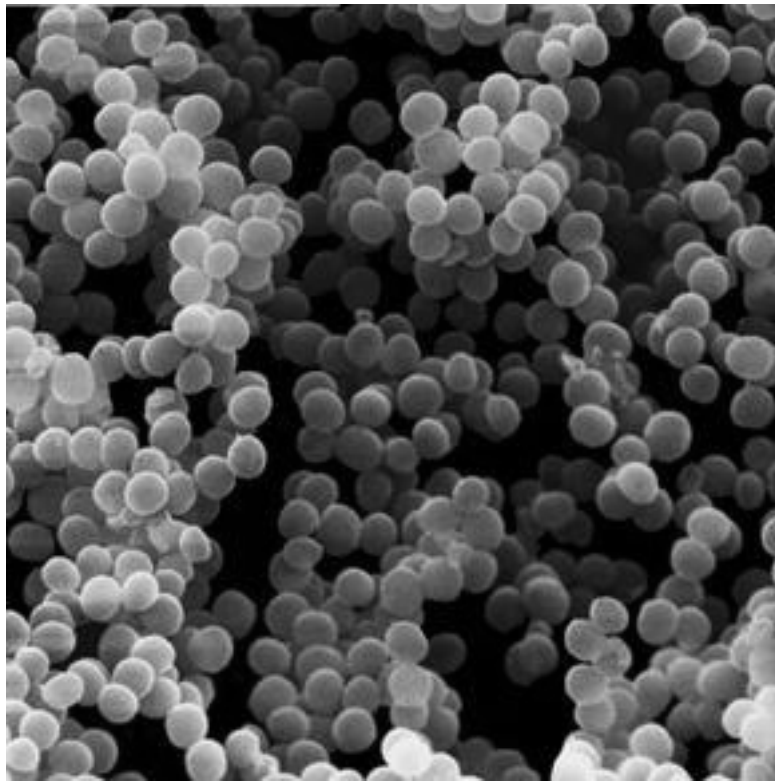
---

fenómeno de mayor relevancia, se ha detectado la presencia de heterorresistencia a vancomicina (hVISA o hGISA) con una frecuencia mucho mayor. En general ésta se sitúa entre el 0 y el 5% dependiendo de las zonas, aunque algunos estudios han apuntado hasta el 20 % en algún hospital. La heterorresistencia se entiende como la presencia de cepas con CMI<sub>s</sub> a vancomicina en el rango sensible (hasta 4 µg/ml) pero que, con frecuencias variables, contienen subpoblaciones con CMI<sub>s</sub> elevadas que podrían seleccionarse al ser expuestas a tratamientos prolongados. Las cepas con heterorresistencia serían precursoras de las cepas con resistencia intermedia (con CMI<sub>s</sub> ≥ 8 µg/ml).

El significado real de la presencia de cepas con heterorresistencia no se conoce. Podrían ser responsables de las dificultades que en ocasiones se presentan para tratar infecciones graves por MRSA, especialmente en situaciones en que hay presencia de cuerpo extraño, abscesos o poca penetración del antibiótico. En un estudio realizado en el Hospital Universitari de Bellvitge en pacientes con infección osteoarticular por MRSA observamos mayor índice de fallos terapéuticos con vancomicina en los pacientes portadores de prótesis articulares que estaban infectados por estas cepas (84). Estudios más recientes han confirmado este punto, reforzando la importancia clínica de un problema creciente. La diseminación de cepas de MRSA de forma epidémica en los hospitales ha supuesto un problema de primera magnitud en el control de la infección nosocomial. La posibilidad de que cepas sin alternativas de tratamiento se diseminen y representen un problema clínico en las UCIs u otras áreas especialmente sensibles nos abocaría a una situación alarmante.

En este contexto, el estudio de las infecciones causadas por cepas con heterorresistencia y por cepas GISA, de su relevancia y de las posibles alternativas de tratamiento, es de gran importancia, pues es necesario conocer si nos enfrentamos a un problema “anecdótico” o a una situación que podría empeorar en los próximos años. La utilización de un modelo animal nos permitiría estudiar estas infecciones *in vivo*, evaluar los tratamientos clásicos con glucopéptidos y compararlos con posibles alternativas.

## **INTRODUCCIÓN**



*Staphylococcus aureus* (racimos). Micrografía electrónica (SEM) x 16000



## 1.INTRODUCCIÓN

### 1.1. *Staphylococcus aureus*: CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

*Staphylococcus aureus* es un coco grampositivo (familia *Micrococcaceae*), no esporulado, de un tamaño entre 0,5 y 1,7  $\mu\text{m}$  de diámetro y que suele agruparse en racimos (del griego *staphyle*, racimo). Es un microorganismo aerobio facultativo, que se caracteriza por fermentar la glucosa y producir catalasa (género *Staphylococcus*); la fermentación del manitol en condiciones anaeróbicas, la producción de coagulasa y de endonucleasa y la sensibilidad a novobiocina, permiten distinguir a la especie *S. aureus* de los estafilococos coagulasa negativos pertenecientes al mismo género. Macroscópicamente, las colonias de *S. aureus* son amarillo dorado, bien definidas, lisas, opacas y convexas y crecen rápidamente en medios sólidos (1 a 3 mm en 24 horas). En agar sangre se observa un halo claro a su alrededor, producto de la  $\beta$ -hemólisis (1, 2).

*S. aureus* se encuentra entre las bacterias patógenas no esporuladas más resistentes, pudiendo sobrevivir en una gran variedad de condiciones ambientales no fisiológicas. Es relativamente resistente al calor y puede tolerar medios con altas concentraciones de sal (hasta 10% de NaCl) o un amplio rango de pH. Su gran adaptabilidad le confiere una notable capacidad para colonizar superficies e individuos, transmitirse en ambientes muy diversos y, en el huésped, llegar a causar gravísimas infecciones. Es, además, un microorganismo de gran versatilidad genética, lo que le permite desarrollar mecanismos de resistencia frente a la mayoría de antibióticos. Por todo ello continua siendo uno de los principales patógenos para el hombre a pesar de la mejora de las condiciones de salud pública, de la implementación de medidas para el control de las infecciones hospitalarias y del arsenal de agentes antimicrobianos disponibles. (1, 2, 3).

## **1.2. PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD ESTAFILOCÓCICA**

La extrema virulencia de *S. aureus* determina que este microorganismo sea la primera causa de mortalidad en las infecciones nosocomiales, a diferencia de otros patógenos con similar o mayor prevalencia (estafilococos coagulasa negativo o bacilos gramnegativos) que causan menor morbimortalidad. Un reflejo de esta virulencia se desprende de los siguientes datos históricos: en 1941 la tasa de mortalidad asociada a la bacteriemia por *S. aureus* en Boston era del 82%; al principio de los 60, ésta era todavía del 27%, a pesar de que ya se disponía de antibióticos  $\beta$ -lactámicos con gran actividad antiestafilocócica. Finalmente, la diseminación de la resistencia a la meticilina en los años 80 ha contribuido a mantener estas cifras hasta la actualidad (4, 5).

Su patogenicidad se basa en el gran arsenal de factores de virulencia de que dispone, que le confieren cualidades específicas en diferentes fases del proceso infeccioso (colonización, adhesión, diseminación,...); destacan especialmente diferentes componentes de la pared celular, proteínas de superficie, la cápsula de polisacárido y una importante dotación de enzimas y toxinas que pueden ser secretados por la bacteria. El modo en que estos factores actúan, en solitario o asociándose, y su interacción con los factores del huésped se conoce sólo parcialmente (1, 6, 7, 8).

La patogénesis de la enfermedad estafilocócica se divide clásicamente en cinco etapas: colonización, infección local, diseminación sistémica y/o sepsis, infección metastásica y toxinosis (5, 6). *S. aureus* coloniza principalmente la mucosa nasofaríngea, aunque también se da la colonización vaginal o perineal. Eventualmente éste se puede transferir a la piel, donde una herida va a representar una puerta de entrada para el microorganismo, dando lugar a celulitis, impétigo, infección de herida o abscesos locales. La infección puede, entonces, extenderse localmente y/o acceder a la sangre (bacteriemia). La extensión de la infección dependerá de la compleja interacción entre los factores de virulencia de la bacteria y los mecanismos de defensa del huésped (1, 5, 6).

La bacteriemia estafilocócica puede conllevar muchas complicaciones, incluyendo el shock séptico y un gran número de infecciones metastásicas: endocarditis, osteomielitis, artritis séptica o la formación de abscesos renales o

epidurales. En ausencia de una terapia específica, la mortalidad asociada a la infección diseminada es alta. En la patogénesis de la fase aguda de la infección estafilocócica pueden estar implicadas sus toxinas. Así, aún si el microorganismo no invade el torrente sanguíneo, el efecto específico local y sistémico de diferentes toxinas puede producir síndromes particulares, como el síndrome del shock tóxico, el síndrome de la piel escaldada o el síndrome por intoxicación alimentaria (5, 6).

En el proceso de la enfermedad vascular estafilocócica tiene gran importancia el papel que juegan las células endoteliales: el estafilococo se adhiere a la célula endotelial con avidez mediante interacciones adhesina-receptor y es fagocitado por éstas, lo que le protege de los mecanismos de defensa del huésped así como del efecto de los antibióticos (9, 10). La infección se puede extender, entonces, a tejidos adyacentes. El papel de las proteínas de superficie que actúan como adhesinas, con gran afinidad por la unión a proteínas de la matriz extracelular es fundamental en la patogénesis de la endocarditis. Este fenómeno se produce tanto en el caso de la válvula nativa dañada, adhiriéndose al trombo fibrino-plaquetario de la superficie valvular afectada, como en el de las válvulas no dañadas, mediante la alteración celular de las células endoteliales invadidas por *S. aureus*, que promoverá la formación de vegetaciones. Estas adhesinas (proteínas de unión a colágeno) también están implicadas en la infección de otros tejidos, como el óseo y el articular (11, 12).

Es importante considerar, también, la influencia en la enfermedad estafilocócica del material sintético, de uso creciente en los hospitales. . El riesgo de infección se incrementa en presencia de material extraño; así, *S. aureus* se adhiere fácilmente a los catéteres intravenosos mediante la unión a los constituyentes séricos que los recubren, lo que facilita la posterior colonización y el acceso a la sangre (13-15). Este proceso se da frecuentemente en la patogénesis de la endocarditis nosocomial. Por otro lado, la infección por vía hematógena de prótesis implantadas en diferentes localizaciones es también un fenómeno en aumento y con alta morbimortalidad.

### **1.3. EPIDEMIOLOGÍA DE *S. aureus***

En los últimos 25 años se ha incrementado la frecuencia de las infecciones por *S. aureus* debido principalmente al creciente uso de catéteres intravasculares y a la diseminación de cepas de *S. aureus* con resistencia a meticilina (MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*) (6, 16). Éstas últimas, que en muchos casos presentan multiresistencia, han protagonizado importantes brotes epidémicos, contribuyendo a que la prevalencia de *S. aureus* en los hospitales no disminuya. El problema se da, además, a escala mundial (17, 18).

Los humanos son un reservorio natural para *S. aureus*, siendo muy frecuente la colonización asintomática. El recién nacido es rápidamente colonizado a nivel nasofaríngeo, perineal y cutáneo; posteriormente, la tasa de portadores se estabiliza entre el 25 y el 40% de la población sana infantil y adulta, y el principal nicho ecológico se localiza en las fosas nasales. Se estima que alrededor de un 20% de la población será un portador persistente y el 60% un portador intermitente de *S. aureus*. El contacto directo con el portador implica la transmisión de la bacteria y genera un nuevo portador (familiares, personal médico). El porcentaje de portadores es superior en determinados grupos, como médicos y enfermeras (hasta un 70%), pacientes con diabetes insulino-dependiente, pacientes que utilizan catéteres intravasculares (hemodiálisis), pacientes quirúrgicos, pacientes con trastornos dermatológicos, drogadictos o pacientes con VIH. El estado de portador es clínicamente importante, pues éstos serán proclives a un mayor número de infecciones en relación con la cirugía o los trastornos dermatológicos. (1, 6, 19, 20).

En la actualidad, *S. aureus* representa la primera causa global de infección nosocomial: es el agente patógeno más frecuente en las infecciones quirúrgicas y el segundo en las bacteriemias de adquisición nosocomial, tras los estafilococos coagulasa-negativo (6, 21, 22, 23,). En Europa, aproximadamente el 30% de todas las infecciones que se producen en las UCIs son atribuibles a *S. aureus* y éste es, también, el principal patógeno aislado en las neumonías nosocomiales en estas unidades (24, 25). La mortalidad global asociada a la bacteriemia por *S. aureus* se sitúa todavía entre el 20 y el 40% (26).

Las infecciones producidas por MRSA representan un problema añadido, por su dificultad de tratamiento y su capacidad para diseminarse. (17, 18, 27). En la década de los 80 se produjo en Europa un incremento muy notable de la incidencia de las infecciones nosocomiales por MRSA, que pasaron del 1% en 1980 al 30% en 1991. En algunos de estos países estas cifras son hoy aún mayores llegando hasta el 50%. En Estados Unidos, estas infecciones representan actualmente el 40% del total de infecciones nosocomiales causadas por *S. aureus*. En un estudio con pacientes con bacteriemia realizado en hospitales españoles en 2000, el porcentaje de resistencia a meticilina se situó en el 28% (28, 29, 30). Por otro lado, en Europa alrededor del 60% de las infecciones por *S. aureus* que se producen en las UCIs corresponden a cepas MRSA (24, 31).

Tradicionalmente, las infecciones por MRSA han sido adquiridas casi exclusivamente en hospitales o entornos similares, donde se dan los factores de riesgo para la colonización y/o infección por estas cepas: enfermedades de base, terapia antibiótica previa, antecedentes de ingreso en una UCI y/o de cirugía o exposición a un paciente colonizado por MRSA (32). Hasta hace poco tiempo, los casos de infecciones por MRSA que se han descrito en la comunidad generalmente se relacionaban con hospitalizaciones recientes, contacto estrecho con personas que habían sido hospitalizadas u otros factores como los citados anteriormente. En otros casos los pacientes eran adictos a drogas vía parenteral y la vía de transmisión era directa (33, 34). En los últimos años, sin embargo, se ha descrito la aparición de cepas MRSA en la comunidad que no se relacionan con ninguno de estos factores. Se conocen como cepas MRSA de adquisición comunitaria (CA-MRSA, community-acquired MRSA), y su prevalencia ha ido en aumento en los últimos años (34). Aunque la epidemiología de estas cepas todavía no se conoce en profundidad, se sabe que presentan características genéticas y microbiológicas diferenciales respecto a las de adquisición nosocomial (NA-MRSA, nosocomial-acquired MRSA), y que ambos tipos de infecciones difieren clínica y demográficamente. Por un lado, la población infectada por CA-MRSA es mayoritariamente joven y sana, a diferencia de la población clásicamente infectada por MRSA, que es de edad avanzada y en muchas ocasiones con enfermedades de base. Las infecciones relacionadas con CA-MRSA son mayoritariamente de piel y tejidos

blandos, mientras que las cepas NA-MRSA se han relacionado siempre con patologías como bacteriemias, infecciones quirúrgicas o neumonías asociadas a ventilación mecánica. Ambos tipos de cepas son genótipicamente distintos. Así, las cepas CA-MRSA conservan mayoritariamente la sensibilidad frente a otros antibióticos no  $\beta$ -lactámicos, mientras que las de adquisición nosocomial son típicamente multirresistentes. Por otro lado, las cepas CA-MRSA presentan el gen PVL (leucocidina Pantón-Valentine, factor de virulencia asociado a la neumonía necrotizante), mostrando un perfil exotoxínico diferente del de NA-MRSA, en la que se detecta principalmente el gen de la toxina del síndrome del shock tóxico (TSST). También se ha asociado mayoritariamente a CA-MRSA con el elemento genético SCC $_{mec}$  tipo IV, que codifica para la resistencia a meticilina, y que no es el tipo predominante en las cepas NA-MRSA, aunque este elemento tiene cierta movilidad genética y su vinculación puede variar en función de la zona geográfica. Por último, CA-MRSA contiene la versión *agr* III del gen regulador accesorio (*agr*), mientras que NA-MRSA se ha relacionado con *agr* I y II (34, 35, 36).

La aparición en los últimos años de cepas MRSA con resistencia intermedia a glucopéptidos (GISA, glycopeptide-intermediate *S. aureus*) y el fenómeno de la heterorresistencia a los mismos (hGISA, heteroresistant GISA) ha encendido algunas alarmas en relación al control y el tratamiento de las infecciones por MRSA (especialmente las más graves). Se han descrito en la literatura alrededor de 20 casos de cepas GISA desde 1997; por otro lado, la prevalencia de cepas con heterorresistencia a glucopéptidos se sitúa entre el 0 y 5%, según la zona geográfica, con excepción de algún estudio (37, 38). En dos estudios realizados en Europa y Japón, se llegó a alcanzar una prevalencia del 25-27% (40, 41); estudios posteriores, sin embargo, no confirmaron estos datos, y el fenómeno no se ha llegado a generalizar en estos términos a otras partes del mundo. En general, estas cepas parecen más frecuentes en determinadas zonas, como Japón, Francia o España (37, 38, 39) y su prevalencia va ligada a la diseminación de determinados clones.

Desde el punto de vista epidemiológico hay dos factores importantes a tener en cuenta en relación a las cepas hGISA y GISA : por un lado, su aparición se ha relacionado, en general, con el uso previo de glucopéptidos en los pacientes

implicados; por otro, la falta de métodos estandarizados para su detección eficaz dificulta la comparación de datos de prevalencia entre diferentes zonas geográficas (37, 38, 42, 43).

#### **1.4. AGENTES ANTIESTAFILOCÓCICOS: GLUCOPÉPTIDOS**

De entre todo el arsenal terapéutico antimicrobiano disponible,  $\beta$ -lactámicos y glucopéptidos son los principales agentes antiestafilocócicos. Las penicilinas anti- $\beta$ -lactamasa son el mejor tratamiento en las infecciones estafilocócicas producidas por cepas sensibles a meticilina, mientras los glucopéptidos son el tratamiento de elección en la infecciones por MRSA.

##### **1.4.1. Historia y principales características**

Los glucopéptidos son un grupo de antibióticos de espectro reducido, que actúan inhibiendo la síntesis de peptidoglucano de la pared bacteriana y se utilizan para el tratamiento de las infecciones por microorganismos grampositivos. Los dos principales fármacos que integran este grupo son vancomicina y teicoplanina. La vancomicina fue introducida en 1956 por su eficacia frente a cepas de *S. aureus* resistentes a penicilina. Su toxicidad y la aparición de la meticilina la relegaron poco después a una posición alternativa en el tratamiento de las infecciones estafilocócicas. Con la extensión de la resistencia a meticilina en *S. aureus* y el aumento en la prevalencia de cepas MRSA en los años 80 y 90 se recuperó de nuevo el uso de vancomicina, en una formulación más refinada y menos tóxica. La teicoplanina fue introducida en 1978, con un espectro y actividad similar y mejores características farmacológicas que vancomicina: vida media más larga, posibilidad de administración intramuscular y un mejor perfil de efectos secundarios. Su uso está extendido en Europa, pero no en Estados Unidos. En los últimos años se han desarrollado nuevas moléculas dentro del grupo de los glucopéptidos, como la oritavancina (aún no comercializada), con similar espectro y mayor actividad frente a enterococos (44-47).

Los glucopéptidos son bactericidas frente a bacterias en fase de división celular y presentan un cierto efecto postantibiótico no superior a 2 h. Sin embargo, a menudo su actividad es únicamente bacteriostática, debido a su mecanismo intrínseco de acción, sus características farmacocinéticas y farmacodinámicas y sus efectos secundarios (44-48). Con todas sus limitaciones y a pesar de la emergencia y el aumento en la prevalencia de cepas con sensibilidad reducida a glucopéptidos en los años 90, la mayoría de cepas de *S. aureus* son todavía sensibles a estos antibióticos.

#### **1.4.2. Estructura**

Químicamente, los glucopéptidos no se relacionan con ningún otro grupo de antibióticos. Son moléculas de estructura compleja, con un heptapéptido central. Las diferencias entre los dos principales glucopéptidos residen en el primer y el tercer aminoácido de la estructura central de siete y en algunos sustituyentes de los otros cinco, que son comunes a ambas moléculas. Vancomicina presenta un disacárido unido a la estructura heptapeptídica, además de otros muchos grupos polares y tiene un peso molecular de 1450 D. Por su parte, teicoplanina está formada por la unión de seis análogos estructurales de la base heptapeptídica, con pesos moleculares entre 1560 y 1890 D. Presenta cadenas de ácidos grasos en lugar de aminoazúcares como la vancomicina, lo que le confiere un carácter marcadamente más lipofílico (entre 50 y 100 veces mayor) y en consecuencia una mayor penetración intracelular y una optimización de sus parámetros farmacocinéticos (44, 48).

#### **1.4.3. Mecanismo de acción**

Las cadenas de peptidoglucano (PG) que conforman la pared celular (PC) se ensamblan en capas que quedan entrecruzadas por puentes interpeptídico que enlazan el dipéptido D-alanil-D-alanina (D-ala-D-ala) de la cadena nascente de PG y la pentaglicina de la cadena adyacente preexistente. El mecanismo de acción de los glucopéptidos se basa en su unión al dipéptido terminal D-ala-D-ala del monómero de mureína, precursor de las cadenas de PG. La unión al dipéptido se puede dar a tres



niveles: en los residuos D-ala-D-ala libres de las capas ensambladas de PG (aproximadamente el 20% de éstos quedan sin unir), en las cadenas nacientes de PG (que todavía no se han unido a las cadenas preexistentes mediante los puentes interpéptido) o en los monómeros de mureína a nivel citoplasmático (diana final). La unión del glucopéptido a las cadenas formadas, no inhibe la formación de cadenas nacientes, aunque dificulta la acción posterior de las PBPs en el ensamblaje de las diferentes cadenas por los puentes interpéptido. Sin embargo, la síntesis del PG queda completamente inhibida si el glucopéptido se une al monómero de mureína a nivel citoplasmático, pues este último ya no servirá como sustrato para polimerizar la cadena naciente. Los glucopéptidos deben atravesar la pared celular, compuesta por aproximadamente unas 20 bandas de PG, que, como se ha mencionado, contienen gran cantidad de dipéptidos D-ala-D-ala libres; muchas moléculas de glucopéptido quedan atrapadas en este nivel y no llegan al citoplasma, lo que compromete su acción y eficacia antibiótica. Esta limitación es especialmente relevante en situaciones con gran acumulación de bacterias, como abscesos u otras infecciones purulentas; en ese caso se requieren actuaciones para reducir la concentración bacteriana (drenajes, cirugía para eliminar abscesos) y facilitar la penetración del antibiótico en la célula y aumentar su eficacia (70, 83).

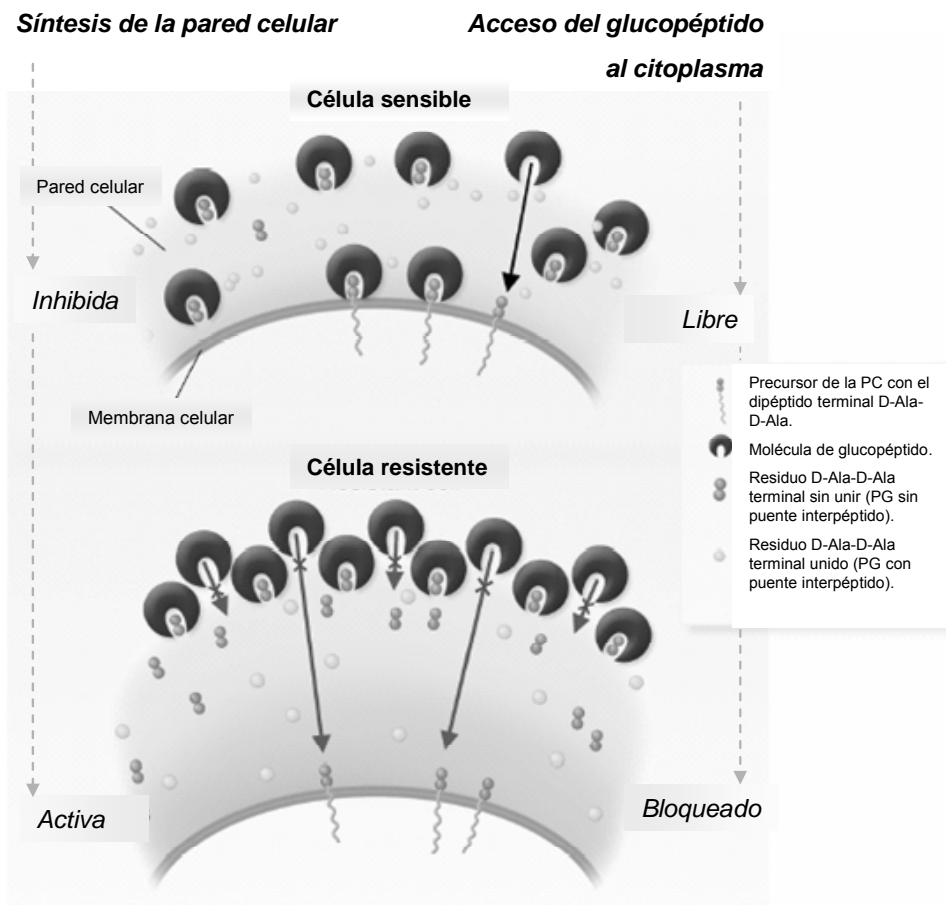
#### **1.4.4. Resistencia a glucopéptidos: mecanismo de *S. aureus***

Se han descrito dos formas de resistencia de *S. aureus* a la vancomicina. Por un lado, el mecanismo identificado en las cepas con resistencia intermedia a glucopéptidos, cepas GISA, y por otro, el hallado en las cepas propiamente resistentes a vancomicina (VRSA o GRSA, vancomycin- o glycopeptide- resistant *S. aureus*). Estas últimas basan su mecanismo de resistencia en la adquisición por conjugación (vía plasmídica) del operón *van A* que contienen las cepas *Enterococcus faecalis* resistentes a vancomicina. *Van A* codifica para un precursor del PG, en este caso mutado, que termina en el dipéptido D-ala-D-lac en vez del original, D-ala-D-ala. El nuevo dipéptido pierde dramáticamente su afinidad por vancomicina y no se une a ésta, de forma que se puede completar el ensamblaje del PG y la síntesis de la pared. La síntesis

del precursor alterado se daría sólo en condiciones de exposición a bajas concentraciones de vancomicina (49, 70). Tan sólo tres casos de cepas clínicas VRSA han sido comunicados, todas ellas en EEUU en los últimos tres años.

En el caso de las cepas GISA, el mecanismo se basa en una serie de alteraciones en la síntesis de la pared celular cuyo origen todavía no se conoce con exactitud, y que implican principalmente el engrosamiento de ésta por acumulación de capas de cadenas de PG, con incrementos adicionales de este número de capas que pueden llegar al 50%. Este engrosamiento supone un mayor atrapamiento de vancomicina respecto al que ya se produce en las cepas sensibles (anteriormente mencionado). De manera simultánea al engrosamiento de la pared, se ha observado una disminución del nivel de puentes interpeptido entre las cadenas de PG ensambladas, lo que se traduce en un menor entrecruzamiento de éstas y una mayor exposición de residuos D-ala-D-ala libres que atrapan todavía más moléculas de vancomicina. La acumulación masiva de las moléculas de glucopéptido en el PG bloquea su acceso al citoplasma, y no pueden inhibir la polimerización de las cadenas nacientes de PG. De manera general se ha correlacionado el grosor de la pared celular con la resistencia a vancomicina (50, 51, 70, 83, 101). La figura 1.1 representa gráficamente este mecanismo.

La base genética para este tipo de resistencia todavía no se conoce en profundidad, aunque se sabe que no tiene relación con la resistencia a meticilina (50, 53). Se ha vinculado la regulación de la resistencia a glucopéptidos con algunos genes (52). En concreto, se ha relacionado la inactivación del gen *tca A*, que codifica para una proteína transmembrana, con el aumento de la resistencia a glucopéptidos (54). Por otro lado, el gen regulador *agr* (accessory gene regulator), importante operón implicado en el control de la expresión de factores de virulencia como adhesinas, exoproteínas o exotoxinas parece jugar un papel definitivo en este tipo de resistencia. Sakoulas y col. han descrito la asociación mayoritaria de uno de los grupos de este gen (existen cuatro), el *agr* group II, con cepas MRSA y GISA y han demostrado, también, la pérdida de la función *agr* por parte de cepas hGISA y GISA; esta pérdida, además, parece tener una relación directa con la heterorresistencia a glucopéptidos (55, 56). La hipótesis que se plantea se basa en que la expresión alterada de *agr* puede conducir al fenotipo hGISA y GISA (37).



**Figura 1.1.** Mecanismo de resistencia de *S. aureus* a vancomicina: cepas GISA. Estas cepas sintetizan cantidades adicionales de peptidoglucano, que se acumula en la pared celular doblando el número de capas de una célula sensible. Simultáneamente se produce un aumento de residuos D-Ala-D-Ala libres. Estos dos factores promueven un atrapamiento masivo de moléculas del antibiótico que bloquean el paso de otras moléculas al citoplasma, donde está su diana final. (Adaptado de ref. 70).

En el caso de la teicoplanina, aunque el engrosamiento de la pared celular también se correlaciona con la resistencia, existen otros mecanismos diferentes que contribuyen a su desarrollo, y que explicarían la observación histórica de que cepas sensibles a vancomicina hayan desarrollado resistencia a teicoplanina (57, 58). Estos mecanismos, no conocidos con exactitud, implicarían la sobreproducción de PBP2' (59).

### **1.4.5. Farmacocinética: eficacia vs toxicidad**

Las características farmacocinéticas de los glucopéptidos son un factor determinante a la hora de valorar su eficacia *in vivo*. En el caso de vancomicina, sus efectos secundarios limitan su margen terapéutico, adquiriendo especial relevancia el estudio farmacodinámico para intentar predecir su eficacia. Los principales parámetros farmacocinéticos de vancomicina y teicoplanina se muestran en la tabla 1.1.

**Tabla 1.1** Parámetros farmacocinéticos de vancomicina y teicoplanina tras la administración de las dosis clínicas convencionales. (Adapt. de ref. 60).

<i>Parámetro</i>	<b>Vancomicina</b>	<b>Teicoplanina</b>
<b>Concentración pico</b> (mg/L)	20–50	43
<b>Concentración valle</b> (mg/L)	5–12 (24h)	<5 (24h)
<b>Unión a proteínas</b> (Alb.) [%]	10–55	90
<b>Volumen de distribución</b> (L/kg)	0.3	0.9–1.6
<b>Vida media</b> (h)	4–8	83–168
<b>Aclaramiento</b> (L/h/kg)	0.058	0.011
<b>Excreción renal</b> (%)	80–90	80
<b>AUC</b> (mgx h/L)	260	550

Vancomicina 1g or 15 mg/kg; teicoplanina 6 mg/kg

AUC: area under the concentration-time curve = área bajo la curva.

Los glucopéptidos no se absorben bien por vía oral (VO); en el caso de vancomicina, además, la administración intramuscular (IM) es muy irritante e incluso produce necrosis. La biodisponibilidad de teicoplanina administrada por vía IM es casi del 100%, mientras que por vía intraperitoneal es menor, entorno al 75%. En el caso de vancomicina es algo más baja, situándose entre 54% – 65% por esta misma vía. Ambos fármacos se eliminan por vía renal, lo que aconseja un ajuste adecuado de las dosis y monitorización de los niveles séricos, especialmente con vancomicina, que puede ser nefrotóxica. Teicoplanina presenta un mejor perfil farmacocinético que vancomicina: su vida media es diez veces superior, debido a su alta tasa de unión a proteínas (en torno

al 90%) y su penetración tisular e intracelular mayor. Vancomicina se une relativamente poco a proteínas (30%). En general, ambos antibióticos presentan una buena penetración en la mayoría de tejidos, aunque ésta es muy variable; existen algunas excepciones, las más importante el líquido cefalorraquídeo, en el que la penetración es baja (44-48, 60).

Tanto la eficacia como la toxicidad de vancomicina se han relacionado con sus concentraciones plasmáticas, con una ventana terapéutica bastante estrecha. Aunque la molécula ha sido muy purificada desde su introducción y actualmente las reacciones adversas son menos frecuentes, vancomicina todavía se relaciona con algunos efectos adversos como flebitis, el "síndrome del hombre rojo" (liberación de histamina que produce prurito y eritema en cuello y tórax, ocasionalmente hipotensión), leucopenia y/o trombocitopenia, fiebre, nefrotoxicidad y ototoxicidad. Tanto la flebitis como el síndrome del hombre rojo pueden minimizarse con infusiones lentas y diluidas. La nefrotoxicidad y la ototoxicidad se han relacionado con concentraciones plasmáticas altas, tanto en el pico como en el valle, aunque el límite de toxicidad no está bien definido. La nefrotoxicidad se ha asociado más concretamente al mantenimiento de concentraciones valle elevadas (20 -30 µg/ml), mientras que la ototoxicidad, se relaciona con niveles plasmáticos superiores a 50 µg/ml. Sin embargo, el tratamiento de algunas infecciones graves pueden requerir valles elevados, próximos a los considerados tóxicos. Para asegurar eficacia y prevenir toxicidad es recomendable la monitorización de sus niveles séricos, especialmente cuando se usan dosis elevadas, se administran tratamientos combinados o, muy especialmente, en los pacientes con insuficiencia renal. En algunos casos en que las concentraciones plasmáticas pueden predecirse se ha propuesto monitorizar sólo la creatinina sérica de forma rutinaria y en otros determinar sólo la concentración valle. El rango terapéutico se define entre 25-40 µg/ml para la concentración pico y unos 10 µg/ml para el valle, lo que asegura niveles muy por encima de la CMI de *S. aureus* incluso en el valle y controla los riesgos de reacciones adversas. En el caso de teicoplanina, la monitorización nos permitiría asegurar la eficacia, sobre todo en situaciones clínicas graves (endocarditis, artritis, quemados) en que la velocidad de eliminación puede ser mayor y los niveles séricos podrían quedarse cortos. La ventana terapéutica de teicoplanina es, en cualquier caso,

más amplia que la de vancomicina y sus reacciones adversas mucho menos frecuentes (44, 47).

#### **1.4.6. Características farmacodinámicas y dosificación**

La escasa ventana terapéutica de vancomicina condiciona con cierta frecuencia la observación de fracasos del tratamiento en infecciones graves que precisan tratamientos prolongados, como endocarditis o infecciones protésicas y osteoarticulares, situaciones que ponen de manifiesto sus limitaciones.

Los glucopéptidos habían sido clásicamente considerados como antibióticos tiempo-dependiente, como los  $\beta$ -lactámicos, los macrólidos y la clindamicina (62-65). En estos casos, el tiempo por encima de la CMI ( $T > CMI$ ) es el parámetro farmacodinámico (PDI, pharmacodynamic index) recomendado para predecir la eficacia clínica (18, 61). Sin embargo, actualmente se considera que la eficacia de los glucopéptidos se relaciona mejor con un patrón mixto, dependiente tanto del tiempo como de una cierta concentración (61, 65, 66). El PDI AUC/CMI, que integra ambas influencias, parece confirmarse como el parámetro que mejor predice la eficacia de los glucopéptidos (66, 67). Se ha establecido que el cociente AUC/CMI debe alcanzar un valor de 125 para garantizar la eficacia del tratamiento (68). En el caso de vancomicina, muchos autores recomiendan mantener unos niveles valle no inferiores a 10  $\mu\text{g/ml}$  (44, 45, 47), lo que asegura estar el 100% del tiempo de exposición por encima de la CMI (dependencia del tiempo) y además garantiza un cociente concentración/sensibilidad alto (alrededor de 10 o más para la mayoría de cepas de *S. aureus*) (dependencia de la concentración). En este punto, la posible disminución de la sensibilidad a los glucopéptidos adquiere una gran relevancia, ya que aumentos en la CMI a 4 u 8  $\mu\text{g/ml}$  dejarían el cociente AUC/CMI (y la relación con una concentración valle de 10  $\mu\text{g/ml}$ ) muy por debajo de los valores recomendados, y, como es sabido, la estrecha ventana terapéutica que ofrece vancomicina no permite aumentar las dosis. Si la eficacia del tratamiento con vancomicina en algunas infecciones por cepas MRSA sensibles a glucopéptidos es ya limitada, la disminución en los valores de los parámetros

farmacodinámicos que se produce en el caso de las infecciones por hGISA o GISA podría anticipar un probable fracaso terapéutico.

La dosis habitual de vancomicina es de 15 mg/kg cada 12 horas (2g/d), vía IV, en infusión lenta, disuelta en suero fisiológico y continua durante un mínimo de 1 hora. La monitorización es recomendable en pacientes con insuficiencia renal, en los enfermos de edad avanzada, obesos, drogadictos, quemados, y pacientes ingresados en las UCIs, en los que los niveles pueden ser erráticos; éstos deben ajustarse para alcanzar y mantener los niveles pico y valle adecuados (equivalentes a los de cualquier paciente). Teicoplanina se puede administrar por vía IV o IM, y la dosis habitual es de 6 mg/kg, inicialmente cada 12h, y a partir de la tercera dosis en monodosis diaria. En infecciones graves, difíciles de tratar, se aconsejan dosis de 12 mg/kg/día e incluso de hasta 20 mg/kg/día en el tratamiento de la endocarditis, que aconseja el mantenimiento de un valle mínimo de 20 µg/ml; por otro lado, en infecciones cutáneas y urinarias más leves la dosis de mantenimiento puede reducirse hasta 3 mg/kg/día. En pacientes con insuficiencia renal se recomienda reducir la dosis a partir del cuarto día (44-48).

## **1.5. EVOLUCIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE *S. aureus***

### **1.5.1. Perspectiva histórica**

Tras el descubrimiento de la penicilina y su revolucionaria introducción en los años 40, *S. aureus* fue el primer patógeno en desarrollar resistencia al β-lactámico. En tan sólo dos años, aparecieron los primeros casos de resistencia a la penicilina. A los 6 años de su introducción, el 25% de las cepas hospitalarias de *S. aureus* eran ya resistentes a la penicilina. Las cepas resistentes a penicilina se extendieron, primero en hospitales y más tarde en la comunidad y en poco más de 20 años, el 80% de las cepas de *S. aureus* eran resistentes a la penicilina (69, 70). El estafilococo había desarrollado un mecanismo de producción de β-lactamasas que hidrolizaban el anillo β-lactámico, unidad estructural y funcional del antibiótico y bloqueaba la acción de la penicilina.

La aparición de la meticilina y resto de penicilinas semisintéticas β-lactamasa-resistentes (cloxacilina, nafcilina) a principios de los años 60 supuso un importante

avance en el tratamiento de la infección estafilocócica, y redujo de manera drástica la mortalidad, que había vuelto a incrementarse a causa del aumento de la prevalencia de cepas resistentes a penicilina. A pesar de la descripción de una primera cepa resistente a meticilina en el año posterior a su introducción, las penicilinas  $\beta$ -lactamasa-resistentes se mostraron durante más de 20 años como eficaces agentes terapéuticos; la aparición y diseminación de cepas de MRSA en los 60 y los 70 fue progresiva y a principios de los 80 se produjeron importantes brotes epidémicos en hospitales de todo el mundo, primero en EEUU y más tarde en Europa y el resto del mundo. Por entonces, éstas ya representaban en torno el 25% de los aislamientos hospitalarios de *S. aureus*. Muchas cepas SARM, desarrollaron además resistencia cruzada a otros grupos de antibióticos, dejando escasas opciones terapéuticas disponibles. El fenómeno SARM generó un problema de salud pública de primer orden, que 20 años más tarde todavía persiste (34, 69, 70).

A pesar del considerable arsenal terapéutico disponible en la actualidad, los glucopéptidos han sido el tratamiento de elección y a veces el único posible en las infecciones por MRSA durante los últimos 20 años. Sin embargo, ya se ha comentado previamente que su eficacia es limitada debido a su discreta actividad bactericida *in vitro*, a sus características farmacocinético-farmacodinámicas y a su toxicidad (a determinadas concentraciones) (71, 72). Se han descrito numerosos fallos terapéuticos en el tratamiento de estas infecciones, especialmente en infecciones graves como endocarditis o infecciones osteoarticulares (71-73). De hecho, se ha demostrado que las infecciones por MRSA tienen peor pronóstico que las causadas por cepas sensibles a meticilina (MSSA) (74). El incipiente fenómeno de la resistencia a los glucopéptidos ha agravado esta problemática en los últimos años.

En 1997 se documentó en Japón el primer aislamiento de una cepa GISA, esto es, con una CMI a vancomicina  $> 4 \mu\text{g/ml}$  (75). Se identificó en un niño que desarrolló una neumonía tras un tratamiento prolongado con vancomicina; se aisló una cepa de *S. aureus* (conocida primero como Mu50) con una CMI de  $8 \mu\text{g/ml}$  a vancomicina (76). Meses después se describió un segundo caso con resistencia intermedia a vancomicina en EE UU, y posteriormente se sucedieron otros en el mismo país, en Europa y el resto del mundo (77-82). El paso previo al desarrollo de estas resistencias



es lo que conocemos como heterorresistencia, fenómeno descrito desde el principio de los 90, pero que no se tuvo en cuenta hasta la aparición de las primeras cepas GISA. Las cepas con heterorresistencia a glucopéptidos, o cepas hGISA, son sensibles a vancomicina o teicoplanina (CMI  $\leq 4$  ó  $8 \mu\text{g/ml}$  respectivamente), pero contienen subpoblaciones resistentes (CMI de  $8 \mu\text{g/ml}$  o más para vancomicina) con una cierta frecuencia (40, 83). Este tipo de cepas representan la etapa precedente a la aparición de las cepas con resistencia intermedia; en condiciones de presión antibiótica con vancomicina se seleccionan estas subpoblaciones resistentes, generando una cepa con resistencia intermedia. Como se ha comentado anteriormente, la heterorresistencia es un fenómeno más generalizado (40, 84-90) y al que se atribuye una creciente relevancia clínica (84-86, 109, 110).

Finalmente, en los últimos tres años se han descrito en EEUU tres casos de cepas MRSA resistentes a vancomicina (VRSA o GRSA), con CMI  $\geq 32 \mu\text{g/ml}$  (91-95). Aunque, de momento, éste parece un fenómeno anecdótico y localizado, su posible extensión tendría importantes implicaciones, puesto que no existiría ningún margen de maniobra en la utilización de glucopéptidos, que perderían su eficacia por completo. El mecanismo de resistencia no está relacionado con el de las cepas GISA y, como se ha comentado, tiene su base genética en la adquisición por conjugación (vía plasmídica) del gen *van A*, procedente de cepas de *Enterococcus faecalis* resistentes a vancomicina.

## **1.5.2. Heterogeneidad y resistencia intermedia a glucopéptidos (hGISA y GISA)**

### **1.5.2.1. Definición, características y significación clínica**

Se ha utilizado diferente terminología en la literatura para describir las cepas de *S. aureus* con sensibilidad disminuida a vancomicina (o glucopéptidos), lo que en ocasiones ha sido causa de cierta confusión. Esta nomenclatura se ha gestado atendiendo a los criterios diversos para los puntos de corte que tienen las sociedades científicas de referencia en diferentes países.

Según la NCCLS (USA), las cepas de *S. aureus* con resistencia intermedia a vancomicina (vancomycin-intermediate *S. aureus*, VISA) son aquellas con CMI para

vancomicina de 8-16 µg/ml. Como la mayoría de cepas VISA son también resistentes a teicoplanina se considera más apropiado el término GISA (glycopeptide-intermediate *S. aureus*) (43, 75). Las cepas con CMI  $\leq 4$  µg/ml son consideradas sensibles, mientras que las  $\geq 32$  µg/ml, son resistentes (vancomycin-resistant *S. aureus*, VRSA o GRSA). El grupo MENSURA (Mesa Española de Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos) asume los mismos criterios para España que la NCCLS norteamericana (96), mientras que en Japón, Suecia o Inglaterra existen criterios ligeramente distintos. Así, la British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) y sus homólogas sueca y japonesa definen a *S. aureus* como resistente a vancomicina (VRSA o GRSA) si su CMI es  $\geq 8$  µg/ml (40, 76, 97-99), sin que exista una categoría intermedia. Por último, la resistencia heterogénea a vancomicina se define en aquellas cepas cuya CMI para vancomicina se sitúa a priori entre 1-4 µg/ml (son sensibles), pero que son capaces de crecer en una placa de BHI-agar suplementada con 4 µg/ml de vancomicina a una frecuencia mínima de  $1/10^6$  ufc. Estas subpoblaciones tendrían CMI de 8 µg/ml o más para el glucopéptido. Para denominar a este tipo de cepas utilizamos el término hVISA (heterogeneous VISA) o, más apropiado, hGISA (extendido a todos los glucopéptidos). En otros países (Japón, Reino Unido, Suecia) se refieren a hVRSA, puesto que las CMI de las subpoblaciones están en el rango de resistencia y no de resistencia intermedia (40, 84-90).

La principal característica de las cepas GISA es el engrosamiento de la pared celular (base del mecanismo de resistencia comentado con anterioridad) (76, 78, 83, 90, 100-102). Otras características comunes a las cepas GISA son su sensibilidad reducida a lisostafina, la autólisis disminuida y una tasa de crecimiento más lenta (90, 103, 104). Macroscópicamente, GISA y hGISA se presentan como una mezcla de colonias grandes y pequeñas, característica que se ha sugerido como diagnóstico potencial en el laboratorio (105). La tabla 1.2, en la siguiente página, describe algunas de las diferencias que se dan entre los fenotipos GISA y hGISA.

**Tabla 1.2.** Resumen de las principales diferencias entre las cepas de *S. aureus* con resistencia intermedia a glucopéptidos (GISA) y aquellas con resistencia heterogénea (hGISA).

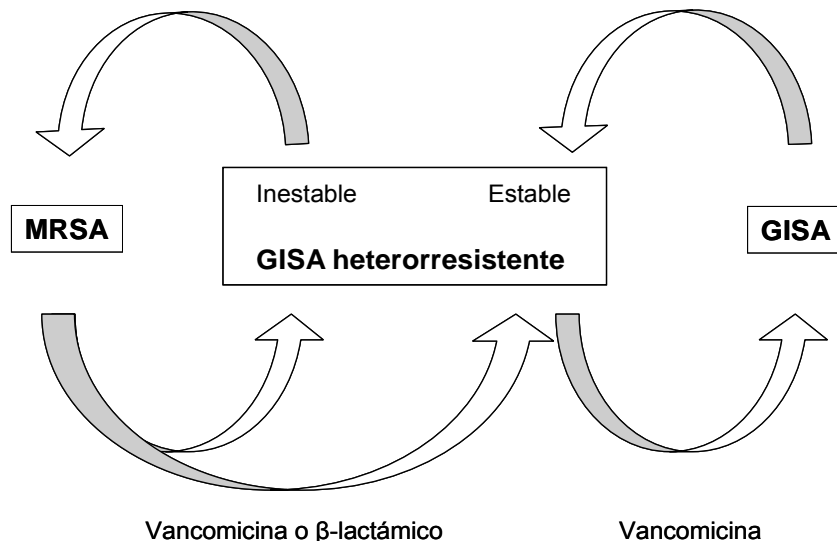
	GISA	hGISA
<b>CIM</b> ( $\mu\text{g/ml}$ ) [clasificación]	8-16 [Res. Intermedia]	2-4 [sensible]
<b>Tipo de Resistencia</b>	Homogénea	Heterogénea (PAP-AUC/Mu3 $\geq 0,90$ )
<b>Mecanismo</b>	Aumento en la producción de PG	Mismo mecanismo
	Disminución en el recambio del PG	
	Aumento residuos D-Ala-D-Ala libres	
<i>Alteraciones bioquímicas y/o celulares</i>	Engrosamiento de la PC y atrapamiento de las moléculas de vancomicina	Efecto gradual (entre VS-MRSA y GISA)
<i>Efecto fenotípico</i>		
<b>Aparición</b>	1997 (1ª cepa descrita)	Principios de los 90
<b>Principal factor de riesgo</b>	Tratamiento prolongado con vancomicina (a partir de hGISA)	Precursor de GISA; selección con bajos niveles de vancomicina
<b>Incidencia</b>	20-25 casos descritos	0-5%

La detección de las cepas GISA en el laboratorio no está exenta de dificultades. Los métodos que se usan de rutina en el laboratorio de microbiología para los tests de sensibilidad, como la difusión en disco o el Microscan no son capaces de detectar la disminución de la sensibilidad a los glucopéptidos de estas cepas (37, 42, 43, 106). Se deben realizar tests de sensibilidad cuantitativos a los aislamientos con CMI de rutina  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ . Se han recomendado diferentes tests para la detección de cepas GISA. El CDC (Center for Disease Control, USA) adopta tres criterios para la detección de una cepa GISA: (i) tener una CMI de 8-16  $\mu\text{g/ml}$  por el método de microdilución, (ii) de  $\geq 6 \mu\text{g/ml}$  por E-test y (iii) crecimiento en 24h en placas BHI que contengan 6  $\mu\text{g/ml}$  de vancomicina a partir de un inóculo de  $10^8$  ufc/ml (99, 107). Otras fuentes recomiendan cultivar las cepas MRSA en placas de Mueller Hinton con 5  $\mu\text{g/ml}$  de vancomicina (108). Ambos métodos son altamente específicos y sensibles.

La detección de cepas hGISA no presenta, todavía, un método estandarizado y absolutamente fiable. La heterogeneidad en la sensibilidad de la población se puede observar mediante el análisis de perfil poblacional (PAP), una técnica compleja que permite estudiar la frecuencia de las subpoblaciones con CMI de 8-16  $\mu\text{g/ml}$ . Se han propuesto diferentes aproximaciones (37, 83) para definir la heterorresistencia; la más

reciente, enunciada por Walsh y col. (37), define a una cepa como heterorresistente a vancomicina si el cociente de las áreas bajo la curva del análisis de perfil poblacional (PAP-AUC) entre esa cepa y la cepa control Mu3 es  $\geq 0,90$  (la cepa control Mu3 fue descrita por Hiramatsu y col.) (40). Realizar este tipo de tests de forma rutinaria es costoso económica y logísticamente para muchos centros, pero la utilización de otros métodos puede comportar resultados poco fiables.

GISA y hGISA han sido descritos como fenotipos inestables, cuya expresión en una u otra forma dependería de la presión selectiva de vancomicina o  $\beta$ -lactámicos. Como se ilustra en la figura 1.2, en presencia del glucopéptido se seleccionarían cepas con resistencia intermedia (CMI  $> 4 \mu\text{g/ml}$ ) a partir del precursor hGISA, pero el fenotipo GISA revertiría a hGISA (CMI  $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ ) en ausencia de vancomicina. En este sentido, en las infecciones causadas por hGISA y GISA que se han descrito, la mayoría de pacientes habían sido tratados previamente con vancomicina o  $\beta$ -lactámicos, dato que refuerza la influencia de la presión selectiva con estos antibióticos (38, 83). La exposición previa a glucopéptidos se considera, pues, el principal factor de riesgo para el desarrollo de resistencias a los mismos, aunque no el único. Algunas enfermedades de base (Diabetes Mellitus, inmunosupresión), la hemodiálisis, las intervenciones quirúrgicas recientes o alguna infección previa por MRSA, así como las infecciones que comportan una alta carga bacteriana (abscesos, endocarditis o infecciones por cuerpo extraño) son también importantes factores asociados (38, 83, 84, 86, 109-111). El impacto clínico de las cepas GISA debe analizarse teniendo en cuenta la mencionada dificultad habitual de tratamiento de las infecciones por MRSA, en muchos casos multirresistentes, y a menudo asociado a fallos terapéuticos con los glucopéptidos (71-73), en infecciones originadas por cepas sensibles; en este contexto, una pérdida de sensibilidad introduce una variable de muy mal pronóstico. De hecho, todas las infecciones asociadas a cepas GISA han tenido un curso muy prolongado y recaídas con fracaso terapéutico. Además, aunque la prevalencia no parece preocupante, la mortalidad asociada a éstas es alta (86).



**Figura 1.2.** hGISA representa un estatus evolutivo de *S. aureus* para adaptarse a la presencia de glucopéptidos. Fenotípicamente se sitúa entre VS-MRSA y GISA. hGISA contiene células GISA con una cierta frecuencia para garantizar su supervivencia como cepa. La exposición prolongada a vancomicina promueve la selección de GISA a partir de hGISA. Las células GISA que sobreviven a la presión antibiótica con vancomicina pueden recuperar el estatus hGISA cuando ésta cesa. De la misma forma, existen ciclos de selección y reversión entre VS-MRSA y hGISA por presión antibiótica con vancomicina o  $\beta$ -lactámicos; algunas cepas hGISA inestables recuperan su estatus VS-MRSA en ausencia de antibiótico. (Adaptado de refs. 83 y 102).

### 1.5.2.2. Implicaciones en el tratamiento y alternativas

Las cepas GISA permanecen sensibles a cotrimoxazol, antibiótico de limitada eficacia. Algunas conservan sensibilidad a cloranfenicol, tetraciclinas, rifampicina o gentamicina. La combinación de algunos de estos antibióticos ha sido el tratamiento utilizado en muchos de los casos de infección por GISA, en general sin éxito (76-82). En los pacientes que siguieron una buena evolución la terapia antibiótica se asoció a un tratamiento concomitante con drenaje quirúrgico del foco de infección o retirada de catéteres (76, 79, 112).

Los nuevos antibióticos y algunas combinaciones son las únicas opciones disponibles potencialmente eficaces. El papel de linezolid, quinupristina/dalfopristina o daptomicina, con muy buena actividad *in vitro* frente a MRSA y GISA, no está bien establecido (88). Estudios experimentales y clínicos aportan datos prometedores de

linezolid frente a GISA y hGISA (110, 114, 115). Entre las combinaciones de antibióticos clásicos que se han sugerido como posibles alternativas está la formada por glucopéptidos y  $\beta$ -lactámicos, que ha mostrado sinergia frente a *S. aureus* con diferentes fenotipos de sensibilidad a glucopéptidos y  $\beta$ -lactámicos en experimentos *in vitro* (116-122). Sieradzki y Tomasz demostraron que la combinación *in vitro* de ambos antibióticos era sinérgica frente a dos cepas GISA, una clínica y una mutante de laboratorio altamente resistente. Según los autores, este efecto se basa en la recuperación de la sensibilidad a los  $\beta$ -lactámicos en estas cepas tras las alteraciones de la pared celular que implica la resistencia a vancomicina (123, 124). Asimismo, Howe *et al* estudiaron las interacciones *in vitro* entre ambos antibióticos frente a cepas de *S. aureus* con diferente sensibilidad (MSSA, MRSA, hGISA y GISA), hallando sinergia a altas concentraciones de vancomicina con  $\beta$ -lactámicos y antagonismo a bajas concentraciones de ambos antibióticos (118). Finalmente, Climo *et al* demostraron que la combinación entre vancomicina y nafcilina fue eficaz *in vivo* en un modelo de endocarditis por GISA en el conejo, en el que el la monoterapia con vancomicina fracasó (121). Posteriormente han surgido informaciones contradictorias sobre el efecto *in vitro* de estas combinaciones, con lo que su posible papel como alternativa terapéutica no ha quedado definido (118, 125-127).

## **1.6. MODELOS ANIMALES DE INFECCIÓN EXPERIMENTAL**

### **1.6.1. Importancia y aplicaciones**

Los modelos animales de infección son un eslabón fundamental entre los estudios *in vitro* y los estudios clínicos. Históricamente, estos modelos han contribuido al conocimiento de la patogénesis de un buen número de enfermedades, y, lo que es más importante, al desarrollo de terapias efectivas para su curación.

Tanto en el desarrollo de nuevos fármacos como en el estudio de los ya existentes, la evaluación en modelos animales es un pre-requisito indispensable como paso previo al ensayo clínico; esta etapa aporta información esencial sobre la eficacia y la seguridad en el caso de nuevos fármacos (esencialmente propiedades relacionadas

con la farmacocinética y la farmacodinámica de la molécula) o sobre la pérdida de eficacia y cómo mejorarla en el caso de fármacos ya existentes (128, 129). En el campo de las enfermedades infecciosas esto es especialmente relevante debido al dinamismo intrínseco de las bacterias, que evolucionan constantemente generando cepas resistentes a la acción de los antibióticos. El desarrollo de resistencias a los antibióticos en diferentes grupos de bacterias se ha incrementado dramáticamente en los últimos 30 años; en este contexto, los modelos animales de infección experimental han tenido un notable papel y van a tener todavía mayor protagonismo en los próximos años (130).

Los modelos animales de infección presentan ventajas incuestionables, como su reproducibilidad, el estudio de diferentes variables en función de los objetivos o la adaptabilidad al análisis estadístico del número de animales (n). Por otro lado, también tienen limitaciones, como la dificultad para mimetizar en los animales la enfermedad humana o el diferente perfil farmacocinético de los fármacos en los animales y en el hombre, que no permite dosificar de la misma forma en un caso y en otro. En este sentido, el criterio principal en los modelos animales es alcanzar los niveles séricos del hombre y/o ajustar los parámetros farmacodinámicos a los humanos, lo que implica, en general, mayores dosis y menores intervalos de dosificación para compensar la rápida eliminación que se produce en los animales) (131). Debe resaltarse que los datos obtenidos en los modelos animales de infección y en los modelos experimentales en general no permiten una extrapolación directa a los humanos, aunque sí sirven de guía para iniciar la investigación clínica .

### **1.7.2. Principales modelos. Modelo de peritonitis en ratón**

En función de algunas de las características mencionadas anteriormente se definen diferentes tipos de modelos animales (130). Los modelos de cribado, como el modelo de septicemia en el ratón, representan un primer test *in vivo* para evaluar la eficacia de un antibiótico o combinación, utilizando típicamente la mortalidad como variable principal. Es el modelo más sencillo y rentable, aunque presenta notables limitaciones: evolución rápida y fatal respecto a la infección en humanos y extrema sensibilidad dependiente del tamaño del inóculo utilizado para provocarla; por estos

motivos, muchas veces se le da a este modelo una orientación más profiláctica. Los modelos *ex vivo* simulan más fielmente la enfermedad humana. Entre éstos están los modelos de cuerpo extraño, en los que la infección es posterior al implante del mismo y, en algunos casos, se cronifica si no se actúa, como sucede en las infecciones protésicas en la clínica; el efecto de los antibióticos y otros parámetros se estudian *in vitro* a partir de las muestras extraídas del cuerpo extraño. Los modelos mono- o poli-paramétricos se centran en el examen de uno ó más parámetros durante el experimento, sin esperar (como los modelos de cribado) al efecto terapéutico último (cura o muerte). Se suelen obtener muestras seriadas de sangre, fluidos o tejidos para el estudio de la eficacia o de mecanismos de acción. Los modelos en pequeños roedores suelen ser ejemplos de modelos monoparamétricos. Los modelos *ex vivo* y monoparamétricos son útiles en la comparación entre antibióticos y, principalmente, permiten investigar efectos de los antibióticos que no pueden ser estudiados en humanos por razones técnicas y/o éticas. Finalmente, los modelos discriminativos son los diseñados para mimetizar al máximo la enfermedad humana. Estos modelos permiten delimitar las indicaciones en las que un antibiótico o combinación puede ser efectivo y/o estudiar las interacciones huésped-antibiótico-microorganismo. Los principales ejemplos son los modelos de endocarditis o de meningitis en el conejo, ampliamente utilizados, aunque también hay otros ejemplos, como el modelo de osteomielitis en conejos o ratas, neumonía en cobayas inmunosuprimidas o algunos modelos de infección del tracto urinario en cerdos o en ratas (130).

El modelo de peritonitis en el ratón es una extensión del modelo original de septicemia. Como se ha comentado, éste ha sido típicamente utilizado como primer cribado *in vivo*, con la mortalidad/supervivencia como variable principal y, generalmente, con una gran sensibilidad al tamaño del inóculo, lo que provoca un rápido desenlace de la infección (131,132). Estas características han hecho de éste un modelo útil pero poco afinado. Sin embargo, éste se puede refinar introduciendo algunas modificaciones (133), aproximándolo más a un modelo *ex-vivo* o monoparamétrico. Con objeto de obtener más información y más precisa se pueden utilizar otras variables, como el recuento en el líquido peritoneal o en sangre, o ajustar el tamaño del inóculo en función de la cepa de ratón o la cepa bacteriana. Además, el



estudio farmacocinético a partir de los niveles séricos permite ajustar diferentes dosis y llevar a cabo estudios más completos. El modelo de peritonitis se ha utilizado con todo tipo de microorganismos y para estudios muy diversos. Entre sus aplicaciones están estudios de eficacia antibiótica, estudios inmunológicos, de patogénesis, de farmacodinámica o la evaluación *in vivo* de las interacciones entre antibióticos (133). *Staphylococcus aureus* ha sido ampliamente utilizado en este modelo.



## **HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**



## 2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Aunque no exentos de limitaciones, los modelos animales permiten establecer una aproximación a la infección que se da en humanos. Los estudios *in vitro* valoran la actividad microbiológica de uno o varios antibióticos frente a un organismo, pero éstos carecen del entorno fisiológico e inmunológico que sí aporta el modelo experimental y que permite una valoración más fiable de la eficacia de un antibiótico o combinación en el tratamiento de una infección.

En este sentido, creemos que un modelo de infección peritoneal en ratón puede ser de gran utilidad para estudiar las infecciones producidas por cepas de MRSA con sensibilidad disminuida a glucopéptidos. Por un lado, nos planteamos cuál es la influencia real de esta pérdida de sensibilidad en la eficacia del tratamiento clásico con glucopéptidos frente a este tipo de cepas (hGISA y GISA). Por otro, resultaría de gran interés evaluar posibles alternativas terapéuticas en este contexto.

Hemos planteado las siguientes hipótesis de trabajo:

- i. La presencia de heterorresistencia a vancomicina podría añadir dificultades al tratamiento de las infecciones por MRSA, especialmente aquellas relacionadas con cuerpo extraño o con abscesos. Este hecho, que ha sido observado por diferentes autores a nivel clínico (84-86, 109, 110), se manifestaría con más claridad en las infecciones causadas por cepas de *S. aureus* con resistencia intermedia a glucopéptidos.
- ii. Algunos estudios *in vitro* han demostrado la actividad sinérgica de la combinación de glucopéptidos y  $\beta$ -lactámicos frente a diferentes cepas de *S. aureus*, incluyendo cepas MRSA con sensibilidad disminuida a glucopéptidos (116-122). Este hallazgo abriría la posibilidad de un tratamiento alternativo para las infecciones producidas por cepas hGISA o GISA, recuperando parte o toda la actividad de los  $\beta$ -lactámicos frente a estas cepas de *S. aureus* cuando se utilizaran conjuntamente con glucopéptidos (123, 124). Este efecto debería confirmarse *in vivo* mediante un modelo animal antes de poder ser recomendado en los pacientes.

Para valorar la eficacia del tratamiento clásico con glucopéptidos en la infección por cepas hGISA y GISA, consideramos necesario incluir en el estudio una cepa sensible a éstos (MRSA), que nos proporcionara un control de la actividad de los glucopéptidos en nuestro modelo. Por otro lado, una cepa sensible a meticilina (MSSA) nos permitiría controlar la eficacia de los  $\beta$ -lactámicos en el modelo, y tener una referencia para valorar posteriormente la eficacia de las combinaciones glucopéptido +  $\beta$ -lactámico. Este diseño validaría el modelo a la vez que nos proporciona unos patrones de actividad de referencia con los que comparar la eficacia frente hGISA y GISA. Así, los  $\beta$ -lactámicos deberían ser activos frente a cepas MSSA y no frente a MRSA, hGISA y GISA, mientras que los glucopéptidos deberían ser activos, como mínimo, frente a las dos primeras.

De esta forma, el estudio incluyó finalmente cuatro cepas de *S. aureus* con diferentes grados de sensibilidad a glucopéptidos y a  $\beta$ -lactámicos: MSSA, MRSA, hGISA y GISA. El estudio *in vitro* con estas cuatro cepas nos permitiría confirmar los datos publicados sobre la actividad de las combinaciones antes de su evaluación *in vivo*. Los antibióticos estudiados fueron, por un lado, los glucopéptidos vancomicina y teicoplanina, y, por otro, los  $\beta$ -lactámicos cloxacilina y cefotaxima. Cloxacilina se escogió como agente estafilocócico clásico frente a MSSA y cefotaxima como  $\beta$ -lactámico de amplio espectro (cefalosporina de tercera generación) de extenso uso clínico y que conserva cierta actividad frente a *S. aureus* pese a no ser un antiestafilocócico de elección.

## **2.1. OBJETIVOS CONCRETOS**

**Primero:** Desarrollar un modelo de peritonitis por *S.aureus* en el ratón.

**Segundo:** Estudiar si las infecciones ocasionadas por cepas de MRSA con heterorresistencia y con resistencia intermedia a gluco péptidos presentan una dificultad terapéutica añadida, mediante la comparación del tratamiento de la peritonitis experimental producida por cuatro cepas de *S.aureus* con diferente sensibilidad a gluco péptidos.

**Tercero:** Estudiar si las combinaciones gluco péptido +  $\beta$ -lactámico (cloxacilina y cefotaxima) presentan actividad sinérgica *in vitro* mediante curvas de letalidad frente a cuatro cepas de *S. aureus* con diferente sensibilidad a gluco péptidos. Estudiar si existe alguna relación entre la sinergia y el grado de resistencia a gluco péptidos.

**Cuarto:** Estudiar si existe diferencia entre la eficacia *in vivo* de la monoterapia con gluco péptidos y una combinación gluco péptido +  $\beta$ -lactámico (cloxacilina y cefotaxima) en el tratamiento de la peritonitis experimental producida por *Staphylococcus aureus* con diferentes grados de sensibilidad a los gluco péptidos.





## **DISEÑO EXPERIMENTAL**



### 3. DISEÑO EXPERIMENTAL

#### 3.1. CEPAS DE ESTUDIO

Tanto en los estudios *in vivo* con el modelo de peritonitis en el ratón como en las curvas de letalidad *in vitro* se utilizaron cuatro cepas de *S. aureus* con diferentes grados de sensibilidad a glucopéptidos y  $\beta$ -lactámicos. Cada una de las cepas representa un perfil de resistencia de *S. aureus* diferente. Las cepas A, B y C, que corresponden a los aislamientos clínicos HUB 954, HUB 283 Y HUB 783, fueron aisladas en el Hospital Universitari de Bellvitge y corresponden, a su vez, a los perfiles de resistencia MSSA, MRSA y hGISA. La cepa D (Mu 50 ó ATCC 700699) es una cepa GISA y fue aislada en Japón en 1997 como la primera cepa con resistencia intermedia a glucopéptidos (76). La cepa C (HUB 783), hGISA, pertenece al clon ibérico y fue confirmada como heterorresistente a vancomicina tras el crecimiento de subpoblaciones a una frecuencia de  $3,6 \times 10^6$  en placas de Mueller-Hinton con 4  $\mu\text{g/ml}$  de vancomicina, como ha sido previamente descrito (84); esta cepa es equivalente a la cepa heterorresistente Mu3, procedente de Japón y aceptada como control de este tipo de cepas (40, 37).

Las CMIs (en la tabla 3.1) de las diferentes cepas a los glucopéptidos y  $\beta$ -lactámicos incluidos en el estudio se determinaron por el método de macrodilución, siguiendo las directrices de la NCCLS (134).

**Tabla 3.1.** CMIs ( $\mu\text{g/ml}$ ) de las cepas de estudio a glucopéptidos y  $\beta$ -lactámicos.

Antibiótico	Cepa A (HUB 954)	Cepa B (HUB 283)	Cepa C (HUB 783)	Cepa D (Mu50)
	MSSA	MRSA	hGISA	GISA
<b>Cloxacilina</b>	0,38	512	1024	1024
<b>Cefotaxima</b>	0,5	1024	1024	2048
<b>Vancomicina</b>	1	2	4	8
<b>Teicoplanina</b>	0,5	1	8	16

---

### **3.2. ESTUDIOS *in vitro*: CURVAS DE LETALIDAD**

Se evaluó la actividad bactericida de vancomicina, teicoplanina, cloxacilina y cefotaxima en solitario, y de vancomicina y teicoplanina en combinación con ambos  $\beta$ -lactámicos. Las concentraciones de los antibióticos se seleccionaron en función de los niveles séricos alcanzables en humanos en todos los casos. En el caso de los glucopéptidos se escogieron concentraciones ligeramente por encima y por debajo de la CMI (4xCMI, 2xCMI, 1xCMI, 1/2xCMI y 1/4xCMI), que son coincidentes con gran parte de la curva concentración-tiempo en suero de éstos. Para los  $\beta$ -lactámicos, ambos con CMIs parecidas, las concentraciones utilizadas variaron entre la cepa MSSA y el resto. En el caso de la primera, se seleccionó un rango de concentraciones desde 2xCMI hasta 1/8xCMI; las concentraciones sub-CMI se evaluaron para comprobar su efecto en las combinaciones (a pesar de no llegar al rango de concentraciones séricas que encontramos en humanos). En cuanto a las cepas resistentes a meticilina, se escogieron concentraciones desde 1xCMI hasta 1/128xCMI (las concentraciones entre 1/16 y 1/128 son las que tienen relevancia, pues las que son superiores superan de mucho las alcanzables en la práctica), utilizando la primera como control de actividad. En las combinaciones se asociaron los glucopéptidos a concentraciones de 1xCMI, 1/2xCMI y 1/4xCMI (las concentraciones por encima de la CMI ya fueron eficaces, por lo que no hubieran permitido detectar un hipotético efecto sinérgico) a los  $\beta$ -lactámicos a las concentraciones citadas anteriormente (2x, 1x, 1/2x, 1/4x y 1/8xCMI para la cepa MSSA y de 1x, 1/4x, 1/16x, 1/64x y 1/128xCMI para las otras tres).

Las curvas de letalidad se efectuaron según el método de la NCCLS (135), utilizando tubos de 10 ml de caldo Mueller-Hinton en los que se prepararon las diferentes concentraciones de los antibióticos en solitario o combinados. Posteriormente se añadió a cada tubo el inóculo de *S. aureus* adecuado para un alcanzar un recuento inicial entre  $5 \times 10^5$  y  $5 \times 10^6$  ufc/ml. Los tubos se incubaron durante 24 horas a 37°C en una estufa con agitación. Se tomaron muestras de cada tubo a las 0, 8 y 24h de incubación y se cultivaron para obtener el recuento bacteriano en cada uno de los puntos horarios. La actividad bactericida se calculó para cada concentración de

antibiótico o combinación a partir del descenso de los recuentos obtenidos a lo largo del tiempo. Los experimentos se realizaron por duplicado.

### **3.3. ESTUDIOS *in vivo*: MODELO DE PERITONITIS Y ESTUDIOS DE EFICACIA**

Los estudios con animales fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universitat de Barcelona.

El modelo de peritonitis en el ratón desarrollado en este estudio es una versión modificada de un protocolo previamente descrito (133, 136, 137). En una primera fase se llevaron a cabo una serie de experimentos para ajustar el modelo a nuestros objetivos. Se estudió la infección peritoneal por *S. aureus* en función de diferentes parámetros (inóculo bacteriano, cepa de ratón, puntos horarios), y se evaluaron las diferentes variables utilizadas en el seguimiento de la infección y/o el tratamiento (recuentos bacterianos, bacteriemia y supervivencia). Se ajustaron los parámetros para conseguir un modelo viable y útil en los estudios terapéuticos posteriores.

Una vez estandarizado el modelo, se realizaron los experimentos terapéuticos, en los que se evaluó la eficacia del tratamiento (con los diferentes grupos terapéuticos definidos más adelante) de la peritonitis producida por cada una de las cuatro cepas de *S. aureus*. Se realizaron también estudios farmacocinéticos con ratones sanos para seleccionar las dosis de antibiótico adecuadas.

#### **3.3.1. Modelo de peritonitis por *S. aureus* en el ratón**

Se estudiaron dos cepas de ratón, la cepa híbrida ICR CD-1 (hembras de entre 6-8 semanas y unos 30 g de peso) y la cepa consanguínea C57BL/6 (hembras de 6 semanas y unos 14-16 g de peso). Los ratones se estabularon en jaulas de (10 ratones/jaula) y tuvieron libre acceso a comida y agua.

La preparación del inóculo bacteriano se realizó en el Servicio de Microbiología del HUB de acuerdo con el siguiente protocolo: a partir de alícuotas congeladas (de las diferentes cepas de *S. aureus*) se hizo un pase a una placa de TSA 5% SB de la cepa a ensayar, que se incubó durante la noche a 37°C. Al día siguiente, se resuspendieron

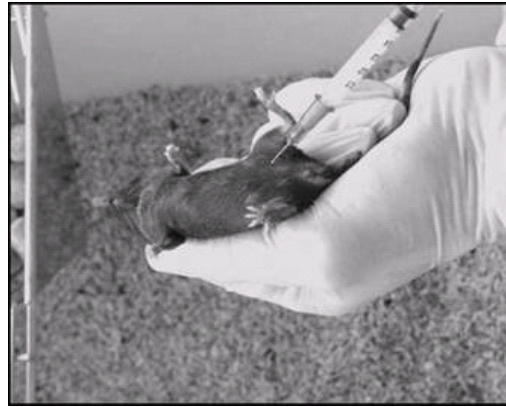
---

algunas colonias en caldo TSB y se hicieron crecer durante 4-6h a 37°C. Inmediatamente antes de la inoculación, el cultivo crecido en TSB se centrifugó y el sedimento bacteriano se resuspendió en suero fisiológico estéril hasta ajustarse a una D.O. de 0.5 McFarland (equivalente a una concentración bacteriana de  $\sim 10^8$  UFC/ml). Posteriormente se hicieron diluciones 1:10 hasta obtener el inóculo adecuado. Se probaron inóculos entre  $10^6$  y  $10^8$  ufc/ml.

El inóculo final utilizado para la infección consistió en la citada suspensión bacteriana a la que se añadió en nuestro laboratorio un 5% de mucina (previa dilución 1:1 de la suspensión bacteriana original con una preparación de mucina porcina al 10% en SF), que se utiliza como adyuvante en la inoculación. La mucina potencia la virulencia basal de la bacteria inhibiendo el sistema local de macrófagos, lo que hace al ratón más susceptible a la infección.

La inoculación se llevó a cabo por inyección intraperitoneal (IP) de 0.5 ml del inóculo (mediante jeringa 26G). Los ratones volvieron a la jaula hasta su sacrificio. Se realizaron estudios de supervivencia y se supervisó la evolución de la infección en diferentes puntos horarios: las 2, 4, 6, 8, 16 y 24 h para seleccionar el momento más adecuado de inicio del tratamiento en los estudios terapéuticos. Los tres parámetros experimentales mencionados, esto es, la cepa de ratón, el tamaño de inóculo y los puntos horarios, se valoraron a partir de tres variables principales: el recuento bacteriano en el líquido peritoneal (LP), la presencia de bacteriemia y la mortalidad. El criterio para ajustar los parámetros experimentales fue, por un lado, elegir la cepa de ratón que fuera más sensible a la infección, que permitiera obtener recuentos altos y homogéneos en LP, hemocultivos positivos, y que éstos se mantuvieran más o menos constantes en el tiempo; por otro, encontrar un tamaño de inóculo lo suficientemente virulento (que cumpliera el criterio anterior), pero que no produjera una mortalidad demasiado alta en las primeras horas tras la inoculación. Esto era particularmente importante si se quería trabajar con controles sin tratamiento en paralelo a los grupos terapéuticos y que éstos sobrevivieran, por lo menos, durante las primeras 24h para poder establecer comparaciones. Los recuentos altos en LP y la bacteriemia permitirían asegurar la infección y con ello un buen punto de partida para valorar la acción de los antibióticos. El punto horario de inicio de tratamiento debía ser aquel que garantizase

todo lo mencionado: infección patente, con recuentos altos en LP y bacteriemia, pero mínima mortalidad. Con estos criterios se analizaron los diferentes parámetros en los puntos horarios mencionados anteriormente.



**Inoculación intraperitoneal**

### **3.3.2. Obtención y procesamiento de muestras**

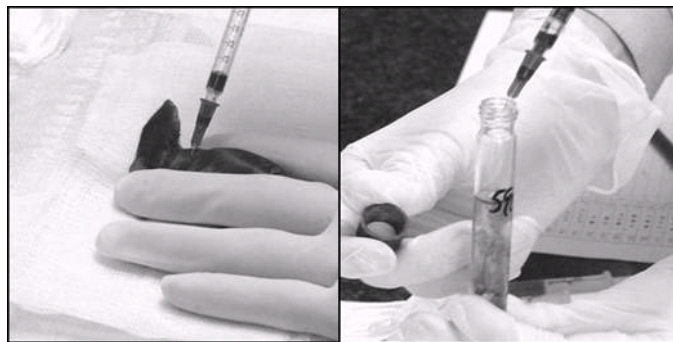
Para la obtención de muestras de líquido peritoneal y sangre en los puntos horarios seleccionados, tanto en los experimentos de estandarización como en los terapéuticos (una vez definido el modelo), se siguió el siguiente protocolo: los ratones se anestesiaron con una dosis de 40  $\mu$ l IP de una combinación de Ketamina/Xylacina (100 mg/kg de Ketamina y 10 mg/kg de Xylacina; combinación 4:1 v/v a partir de los viales comerciales). Con el animal dormido, se realizó un lavado peritoneal inyectando 2 ml de SF IP seguido de un masaje externo abdominal de un minuto para homogeneizar el contenido peritoneal. Inmediatamente, se extrajeron 100  $\mu$ l de sangre por punción intracardiaca y, en este punto, el animal se sacrificó por dislocación cervical. A continuación, se abrió el abdomen y se recuperaron 200  $\mu$ l de LP mediante técnica aséptica. Las muestras de LP se utilizaron para el recuento de colonias. Se realizaron cultivo directo (10  $\mu$ l) y diluciones seriadas 1:10 en SF, que se sembraron (100  $\mu$ l) en placas de TSA 5% SB y se incubaron 24h a 37°C. El límite de detección para el recuento con este método fue de 10<sup>1</sup> ufc/ml. Para evitar las posibles interferencias en el recuento por efecto del arrastre del antibiótico, la muestra se depositó en el centro de la placa, se

---

dejó que fuera absorbida por el agar y, una vez seca, se extendió sobre la placa. Respecto a las muestras de sangre, tras la punción intracardíaca, los 100  $\mu$ l de sangre se cultivaron en caldo TSB (24h a 37°C). Al día siguiente, se sembraron 100  $\mu$ l en placa y se incubaron nuevamente 24h a 37°C para comprobar el crecimiento bacteriano y, por tanto, la presencia o no de bacteriemia. La bacteriemia se expresó en forma cualitativa, como porcentaje de hemocultivos positivos. Por último, se hizo un seguimiento de la mortalidad en los diferentes puntos horarios (desde las 2 hasta las 24h post-inoculación), que expresó también como porcentaje de éxitos.



**Lavado peritoneal y extracción de líquido para cultivar**



**Extracción de sangre para hemocultivo**

### **3.3.3. Estudio farmacocinético y cálculo de parámetros PK/PD**

Antes de iniciar los experimentos terapéuticos se realizaron estudios farmacocinéticos con cada uno de los antibióticos. El objetivo de éstos fue seleccionar



las dosis y establecer los regímenes de dosificación más adecuados para alcanzar un perfil farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD) lo más parecido al humano. Para ello, además de los parámetros farmacocinéticos básicos, se calcularon los parámetros farmacodinámicos que habitualmente se utilizan como para predecir la eficacia, y que dependen de cada grupo de antibióticos. Más abajo se concretan los parámetros utilizados.

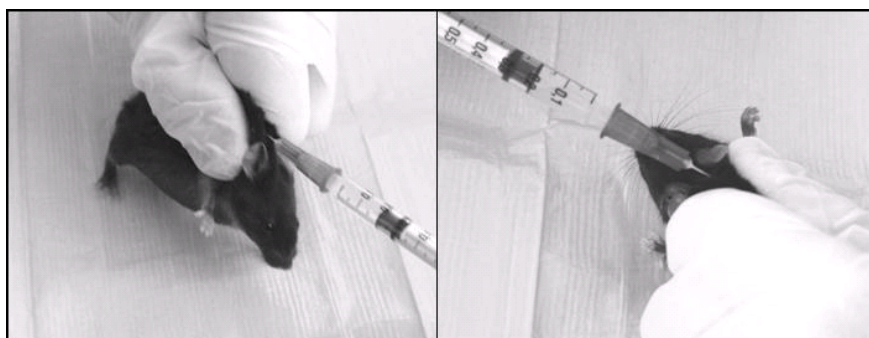
Para el estudio farmacocinético de cada uno de los antibióticos se utilizaron 20-22 ratones sanos. La elección de las primeras dosis a ensayar se efectuó basándonos en estudios farmacocinéticos previos con ratones (62, 137-142). El antibiótico se administró vía subcutánea, en una dosis única y ajustada al peso de cada ratón. Tras la administración del antibiótico, grupos de 3 ratones fueron asignados aleatoriamente a un punto horario para la obtención de muestras, hasta completar 6 puntos por cada antibiótico. En cada punto, los animales se anestesiaron según la pauta descrita anteriormente y se les extrajo sangre (400-500  $\mu$ l) mediante una incisión en el plexo periorbital del ojo (el ratón muere por exsanguinación bajo el efecto de la anestesia). A continuación, las muestras de sangre se centrifugaron (10 min.; 5000 rpm), se recuperó el suero y se guardó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

Los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos se calcularon con la ayuda de una aplicación informática (PK Functions for Microsoft Excel. Usansky, J. I., Desai, A. and Tang-Liu, D. Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan, Irvine, CA 92606, U.S.A.) a partir de la concentración de antibiótico en suero en los diferentes puntos horarios (gráfica concentración-tiempo). Se calcularon los siguientes parámetros farmacocinéticos: concentración pico en suero ( $C_{\text{max}}$ ), vida media ( $T_{1/2}$ ; a partir de la constante de eliminación), área bajo la curva (AUC; a partir de la curva concentración-tiempo) y a partir de éstos los parámetros farmacodinámicos (PDIs, pharmacodynamic indices): cociente de inhibición (IQ;  $\text{IQ} = C_{\text{max}}/\text{CMI}$ ), AUC/CMI (o AUIC) y tiempo en que la concentración del antibiótico en suero está por encima de la CMI ( $T > \text{CMI}$ ).  $T > \text{CMI}$  es el PDI que mejor predice la eficacia de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, mientras que para los glucopéptidos no existe todavía un consenso sobre cuál o cuáles son los parámetros y se tienen en cuenta, tanto el  $T > \text{CMI}$  como el IQ (61, 65, 66). Algunos autores consideran el parámetro AUC/CMI, que

---

estaría entre los dos anteriores (66-68), como el mas apropiado, mientras otros se inclinan por la concentración sérica valle (44, 45, 47).

Finalmente, basándonos en la farmacocinética humana (44-47, 60), en estudios farmacodinámicos previos (61, 62, 65-68, 137) y, finalmente, en los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos obtenidos, seleccionamos las dosis finales que iban a ser administradas a los animales. Vancomicina se administró a 30 mg/kg/4h (dosis diaria total de 180 mg/kg), teicoplanina a 40 mg/kg/24h (dosis diaria total de 40 mg/kg), cloxacilina a 160 mg/kg/2h (dosis diaria total de 1,6g/kg) y cefotaxima a 200 mg/kg/2h (dosis diaria total de 2g/kg).



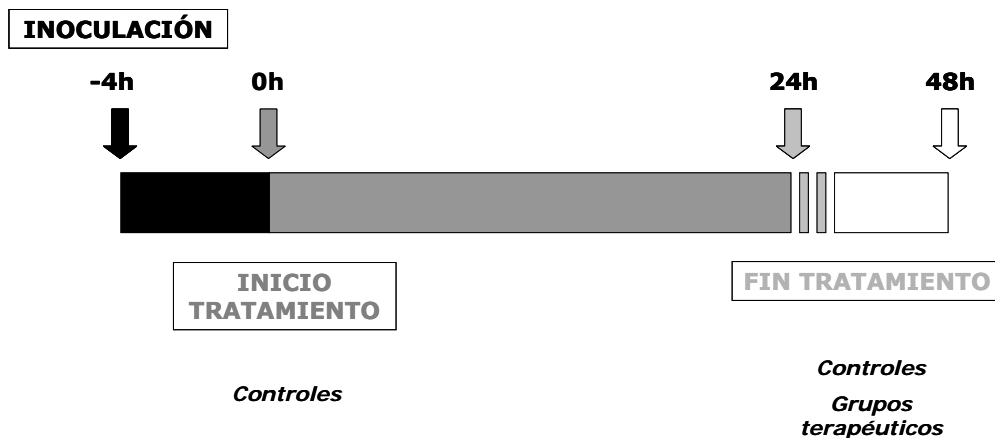
**Administración subcutánea del antibiótico**

#### **3.3.4. Determinación de la concentración de antibiótico**

La concentración de los antibióticos en suero se determinó empleando diferentes técnicas en función del grupo de antibióticos. La concentración de los glucopéptidos (vancomicina y teicoplanina) se realizó mediante la técnica de inmunoensayo de polarización fluorescente (FPIA, fluorescent polarization immunoassay) con ayuda de un analizador TDx y de los reactivos, controles y calibradores facilitados por la firma que los comercializa (ABBOTT CIENTÍFICA S.A., Diagnostics Division, Costa Brava 13, 28034 Madrid). El límite de detección se situó en 2 µg/ml para vancomicina y 1,7 µg/ml para teicoplanina. Las concentraciones de los β-lactámicos (cloxacilina y cefotaxima) se determinaron mediante bioensayo de difusión

en disco (o método microbiológico) (143). Los microorganismos indicadores utilizados fueron *S. aureus* ATCC 29213 para cloxacilina y *E. coli* ATCC 25922 para cefotaxima y se usó Antibiotic Medium No. 1 de DIFCO Labs. como medio de cultivo. El nivel de detección fue de 0,5 µg/ml para cloxacilina y 1 µg/ml para cefotaxima.

### 3.3.5. Experimentos terapéuticos: protocolo final y pautas antibióticas



**Figura 3.1.** Esquema del diseño experimental del modelo de peritonitis por *S. aureus* en el ratón.

El diseño de los experimentos terapéuticos de la peritonitis por las diferentes cepas de *S. aureus* se esquematiza en la figura 3.1. Cuatro horas después de la inoculación, se inició el tratamiento. En este punto (hora 0), se asignó aleatoriamente a los ratones a una pauta antibiótica o al grupo control sin tratamiento (se les administró SF como placebo) y se administró la primera dosis de cada uno de los antibióticos o combinaciones. Las pautas antibióticas estudiadas (correspondientes a los diferentes grupos terapéuticos) se encuentran en la tabla 3.2. En cada experimento, a la hora 0 se sacrificaron 2 ratones como controles de la infección. El tratamiento antibiótico (o placebo) se prolongó durante 24h, momento en el que todos los ratones fueron sacrificados para obtener muestras de sangre y LP (hora 24), siguiendo el protocolo descrito anteriormente. En cada experimento se trabajó con 20 ratones, incluyendo

---

controles (horas 0 y 24) y grupos terapéuticos (hora 24) y con un mínimo de dos pautas antibióticas por experimento. Los experimentos se realizaron semanalmente hasta completar el número de ratones necesario estadísticamente.

**TABLA 3.2.** Pautas antibióticas evaluadas en el tratamiento de la peritonitis para cada una de las cuatro cepas. Monoterapias, combinaciones y controles.

---

<b>Cloxacilina 160 mg/kg/2h (CLO)</b>
<b>Cefotaxima 200 mg/kg/2h (CTX)</b>
<b>Vancomicina 30 mg/kg/4h (VAN)</b>
<b>Teicoplanina 40 mg/kg/24h (TEI)</b>
<b>Vancomicina + Cloxacilina</b>
<b>Vancomicina + Cefotaxima</b>
<b>Teicoplanina + Cloxacilina</b>
<b>Teicoplanina + Cefotaxima</b>
<b>CONTROL (Placebo con SF)</b>

---

En los experimentos correspondientes a la infección por las cepas GISA y hGISA, se investigó la posibilidad de cambios en la sensibilidad de estas cepas a los glucopéptidos por la selección de subpoblaciones resistentes a vancomicina o teicoplanina a lo largo del tratamiento experimental con éstos. Así, se realizó una nueva determinación de la CMI a las colonias crecidas a partir del LP de ratones tratados con glucopéptidos durante 24 h. La eficacia de un antibiótico o combinación se midió como el descenso en el recuento bacteriano tras 24h de tratamiento con esa pauta.

### **3.3.6. Análisis farmacodinámico**

Más allá del cálculo de los parámetros farmacodinámicos que nos ayudan a predecir la eficacia (ver apartado 3.3.3), se realizó un análisis ulterior con objeto de

reforzar algunas de las conclusiones sobre nuestros resultados, esencialmente sobre la eficacia de vancomicina y su combinación con cloxacilina. Con esta idea, estudiamos, primero, el resultado de la monoterapia con vancomicina y posteriormente el de las combinaciones. En el primer caso, el análisis consistió en realizar una regresión lineal para valorar la correlación entre la eficacia *in vivo* de vancomicina y la sensibilidad de ésta para cada cepa (o también los PDIs de vancomicina para cada cepa, que son proporcionales a su sensibilidad). El análisis de la eficacia de las combinaciones fue más complejo. Evaluamos la eficacia de la combinación vancomicina y cloxacilina según el método de Mouton y col. (144). Tal como se ha descrito anteriormente (apart. 3.3.3), se calcularon los PDIs para vancomicina y cloxacilina, y obtuvimos diferentes valores a partir cada una de las cepas del estudio (por su diferente sensibilidad). La eficacia de la monoterapia con vancomicina o cloxacilina fue entonces descrita como una función del PDI más apropiado para cada uno de los antibióticos, y esto se hizo mediante un modelo de regresión lineal. En el caso de cloxacilina está ampliamente aceptado que el  $\tau$ CMI es el índice que mejor predice la actividad de los  $\beta$ -lactámicos; para vancomicina, se observó que la mejor correlación con la eficacia fue para el parámetro AUC/CMI (la selección del índice más apropiado se hizo previamente mediante un análisis de regresión múltiple entre los diferentes PDIs posibles:  $\tau$ CMI, Pico/CMI, AUC/CMI y la eficacia de la monoterapia). Una vez descrito el modelo de la eficacia de cada antibiótico en solitario como función de su mejor PDI, se procedió a determinar la contribución de esos PDIs a la eficacia de la combinación, esto es, en qué grado los índices que predicen la eficacia de las monoterapias por separado pueden predecir la eficacia de la combinación. Para ello se realizó un análisis de regresión múltiple (entre la eficacia experimental observada de la combinación y los PDIs de vancomicina y cloxacilina). Paralelamente a este análisis se realizó otro en el que se calculó una predicción de la eficacia de la combinación (una eficacia teórica de la combinación, no la eficacia experimental observada) a partir de la combinación lineal de los dos modelos de regresión calculados en primer lugar (eficacia monoterapias vs mejores PDIs). Finalmente, la eficacia teórica predicha se compara con la eficacia experimental observada. A partir de esta comparación podremos hacer un análisis más completo del papel de las combinaciones.

---

Las diferentes regresiones (regresión lineal simple y regresión múltiple) se calcularon con ayuda de la aplicación estadística SPSS.

### **3.3.7. Estadística**

Los datos de los recuentos bacterianos se presentaron como log UFC/ml  $\pm$  desviación estándar (SD). Se calculó el tamaño muestral a partir de los datos de los experimentos piloto: asumiendo una desviación estándar de 0,5 - 0,75 log UFC/ml y una diferencia de medias (a detectar como significativa) de  $\sim 1$  log UFC/ml, el número final de animales por pauta fue de entre 6 y 8 (según SD final), para un nivel de significación de 0,05 y una potencia del 80%.

Se comprobó la distribución normal de los datos relativos a los recuentos bacterianos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los diferentes grupos terapéuticos (incluyendo todas las pautas y los controles) se compararon mediante el Análisis de la Varianza (ANOVA) con el test de Scheffé como prueba *post hoc*. Las comparaciones entre diferentes cepas (para un mismo tratamiento) se realizaron también con ANOVA. Por otro lado, se utilizó el test exacto de Fisher con doble cola en la comparación de variables dicotómicas no numéricas (bacteriemia, mortalidad). En todos las pruebas se consideró estadísticamente significativo un *P*-valor  $< 0,05$ . Tanto en las comparaciones de medias como en los modelos de regresión para el análisis farmacodinámico descrito en el apartado anterior se utilizó el programa estadístico SPSS.

## **RESULTADOS**





## 4. RESULTADOS (por objetivos y trabajos publicados)

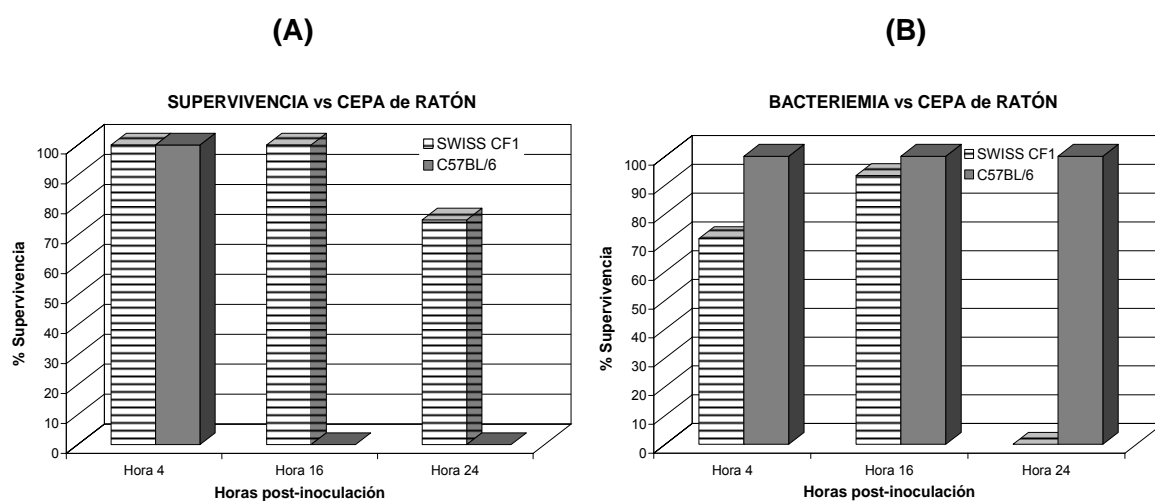
### 4.1. OBJETIVOS PRIMERO Y SEGUNDO

Domenech A, Ribes S, Cabellos C, Dominguez MA, Montero A, Linares J, Ariza J, Gudiol F. "A mouse peritonitis model for the study of glycopeptide efficacy in GISA infections." Microbial Drug Resistance 2004; 10:346-53.

#### 1. Desarrollar y estandarizar un modelo de peritonitis por *S. aureus* en el ratón.

El primer objetivo se desarrolla en la primera parte de este trabajo, que describe el diseño final del modelo de peritonitis por *S. aureus* utilizado en nuestros experimentos, incluyendo la selección de la cepa de ratón, el inóculo bacteriano y los puntos horarios de control más adecuados; también se llevó a cabo el estudio farmacocinético y farmacodinámico para la determinación de las dosis experimentales más aproximadas a las utilizadas en humanos.

En el trabajo se ilustra la mayor homogeneidad en los recuentos en LP por parte de la cepa de ratón C57BL/6 tras la inyección intraperitoneal de un inóculo de  $10^6$  ufc/ml de *S. aureus* (figura 1.A, artículo). Las comparaciones entre la media de los recuentos en LP (también fig. 1.A), el porcentaje de bacteriemia y la supervivencia (figura 4.1, abajo) mostraron finalmente la cepa C57BL/6 mas susceptible a la infección.



**Figura 4.1.** Porcentaje de (A) supervivencia y (B) bacteriemia de ratones con peritonitis por *S. aureus* durante las primeras 24h tras la inoculación (inóculo  $10^7$  ufc/ml). Comparación de las cepas de ratón SWISS CF1 y C57BL/6.

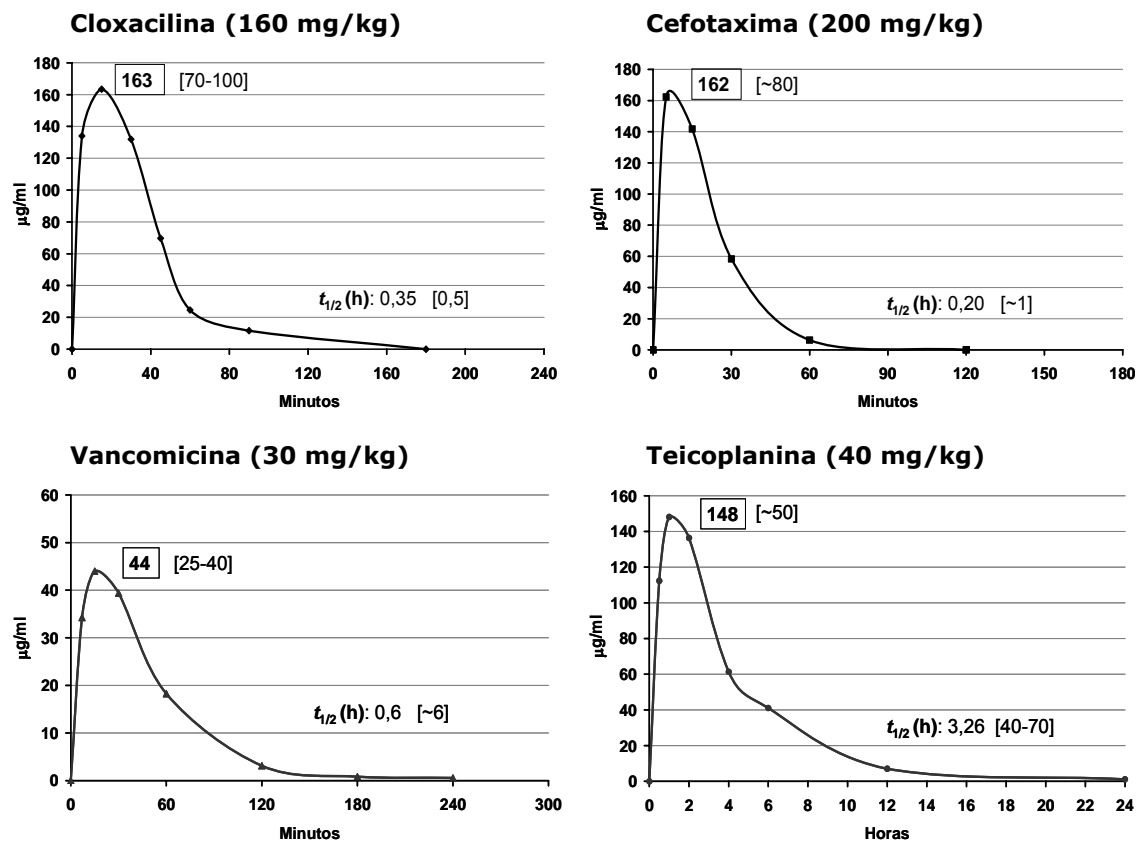
El inóculo final se seleccionó en función de los recuentos y la mortalidad observada en los ratones tras la administración intraperitoneal de diferentes inóculos de *S. aureus* (fig. 1.B, art.;  $10^6$  vs  $10^7$  ufc/ml): con el inóculo de  $10^6$  ufc/ml se obtuvo una mayor supervivencia a lo largo de las primeras 24h tras la inoculación. Este inóculo permitió alcanzar recuentos constantes en el tiempo de 7 log cfu/ml en LP y la tasa de bacteriemia fue del 100% (fig. 1.A, art. y figura 4.1, arriba). Inóculos mayores ( $10^8$  ufc/ml) resultaron en una mortalidad muy temprana, mientras que inóculos menores ( $10^5$  ufc/ml) no consiguieron un nivel alto y constante de recuentos peritoneales y el porcentaje de bacteriemia fue muy bajo.

La elección de la cepa C57BL/6 y el inóculo de  $10^6$  ufc/ml permitió a los animales sobrevivir las primeras horas post-inoculación, y hacerlo con recuentos en LP altos y homogéneos que permanecieron constantes hasta las 24h; esto se observó en las infecciones producidas por las cuatro cepas incluidas en el estudio, lo que garantizó la comparación con controles sin tratamiento en todos los experimentos terapéuticos. La mortalidad varió en función de la cepa. La tabla 4.1 resume estos datos.

**Tabla 4.1.** Recuentos en LP, porcentaje de bacteriemia y supervivencia a las 4 y 24 horas de la inoculación intraperitoneal de cada una de las cuatro cepas de *S. aureus*.

	Cepa A (MSSA)	Cepa B (MRSA)	Cepa C (hGISA)	Cepa D (GISA)
<b>Recuentos en LP-4h/24h (log [cfu/ml] ± SD)</b>	6,95±0,62 / 7,62±0,37	7,01±0,63 / 7,05±0,43	7,18±0,73 / 7,04±0,55	7,02 ± 0,75 / 7,02±0,35
<b>Bacteriemia (%) -4h/24h</b>	100 / 100	100 / 100	100 / 100	100 / 100
<b>Mortalidad (%) -4h/24h</b>	0 / 55	0 / 22	0 / 62	0 / 21

Los principales parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de los antibióticos estudiados obtenidos en el suero de ratón se resumen en la tabla 2 del artículo. A continuación (figura 4.2) se muestran las gráficas concentración-tiempo de cada uno de ellos.



**Figura 4.2.** Gráficas concentración-tiempo de los antibióticos estudiados. Se incluyen los valores del pico sérico y la vida media para cada antibiótico (entre corchetes, rango de los valores de referencia en humanos). Datos obtenidos a partir de la administración de la dosis especificada por vía subcutánea.

2. Estudiar si las infecciones ocasionadas por cepas de MRSA con heterorresistencia o con resistencia intermedia a glucopéptidos presentan una dificultad terapéutica añadida, mediante la comparación del tratamiento de la peritonitis experimental producida por cuatro cepas de *S. aureus* con diferente sensibilidad a glucopéptidos.

Este objetivo se aborda en la segunda parte del artículo. Se muestra el resultado del tratamiento de la peritonitis (por las diferentes cepas de *S. aureus*) con las diferentes monoterapias y posteriormente se analiza la monoterapia con glucopéptidos en la infección producida por cada una de las cuatro cepas. La supervivencia fue del 100% para todos los grupos terapéuticos en los experimentos con las cepas A y B; frente a la infección por las cepas C y D, la mortalidad del grupo cefotaxima fue del 66% y el 14%

respectivamente; en el resto de grupos terapéuticos (incluido cloxacilina), sobrevivieron el 100% de los animales. El descenso en los recuentos bacterianos en el LP tras el tratamiento de 24h ( $\Delta\log$  cfu/ml) con las cuatro monoterapias (más el grupo control sin tratamiento) y para las cuatro cepas incluidas en el estudio (fig. 2, art.) resume los experimentos terapéuticos; la bacteriemia en los diferentes grupos terapéuticos (figura 4.3, abajo) complementa los resultados obtenidos a partir de los recuentos en LP. Vancomicina fue ligeramente mejor como monoterapia que teicoplanina. Se observó cómo la eficacia de vancomicina y teicoplanina en monoterapia disminuye de manera estadísticamente significativa entre las cepas A y B y la cepa C y entre las cepas A y B y la cepa D (figura 3.A, artículo). La regresión lineal entre los recuentos en el LP tras la monoterapia con vancomicina (proporcional a la disminución del recuento y a la eficacia) y la sensibilidad de ésta mostró una buena correlación ( $R^2=0,595$ ) entre ambas (figura 3.B, artículo).

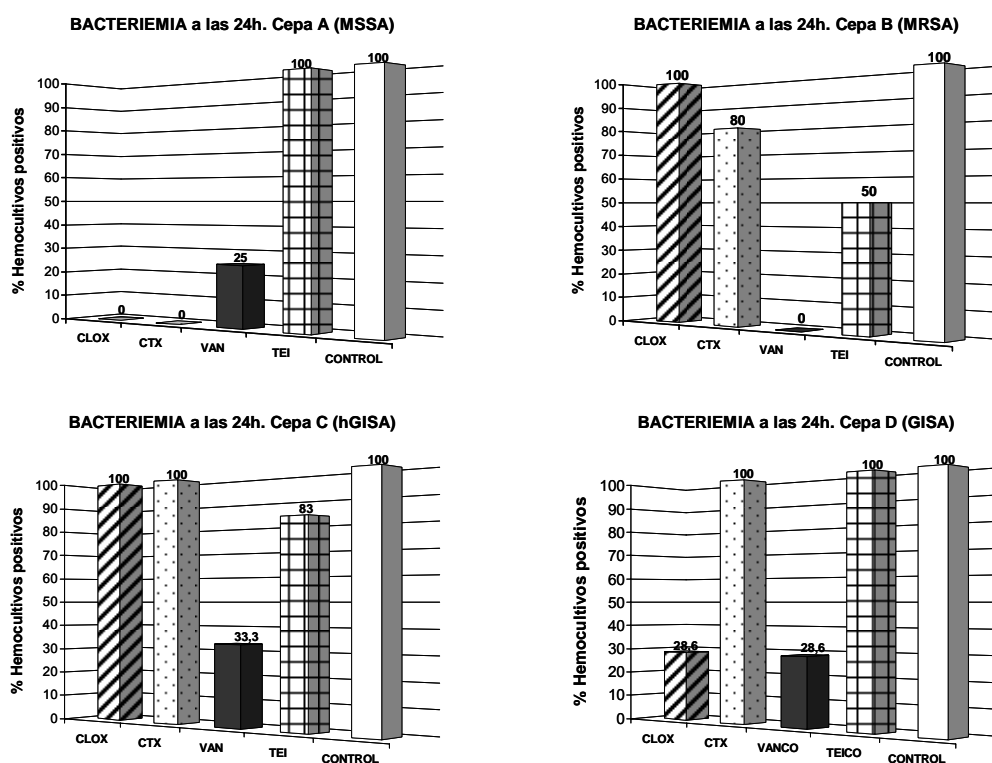


Figura 4.3. Bacteriemia (% de hemocultivos positivos) en la infección peritoneal producida por las cuatro cepas estudiadas tras 24h de tratamiento con las distintas monoterapias.

## A Mouse Peritonitis Model for the Study of Glycopeptide Efficacy in GISA Infections

ALEJANDRO DOMENECH,<sup>1</sup> SANDRA RIBES,<sup>1</sup> CARMEN CABELLOS,<sup>1</sup> M. ANGELES DOMÍNGUEZ,<sup>2</sup>  
ABELARDO MONTERO,<sup>1</sup> JOSEFINA LIÑARES,<sup>2</sup> JAVIER ARIZA,<sup>1</sup> and FRANCESC GUDIOL<sup>1</sup>

### ABSTRACT

In recent years, the emergence of *Staphylococcus aureus* strains with reduced susceptibility to glycopeptides has raised considerable concern. We studied the efficacy of vancomycin and teicoplanin, as well as cloxacillin and cefotaxime, against the infection caused by four *S. aureus* strains with different glycopeptide and  $\beta$ -lactam susceptibilities (strains A, B, C, and D; MICs for vancomycin of 1, 2, 4, and 8  $\mu\text{g/ml}$  respectively), using a modified model of mouse peritonitis. This optimized model appeared to be straightforward and reproducible, and was able to detect low differences in bacterial killing between antibiotics and also between different *S. aureus* strains. Bactericidal activities in peritoneal fluid for vancomycin, teicoplanin, cloxacillin, and cefotaxime decreased from  $-2.98$ ,  $-2.36$ ,  $-3.22$ , and  $-3.57 \log_{10}$  cfu/ml, respectively, in infection by strain A (MICs for vancomycin and cloxacillin of 1 and 0.38  $\mu\text{g/ml}$ , respectively) to  $-1.22$ ,  $-0.65$ ,  $-1.04$ , and  $+0.24$  in peritonitis due to strain D (MICs for vancomycin and cloxacillin of 8 and 1,024  $\mu\text{g/ml}$ ). Our data confirm the superiority of  $\beta$ -lactams against methicillin-susceptible *S. aureus* and show that bactericidal activity of glycopeptides decreases significantly with slight increases in MICs; this finding suggests a reduced efficacy of glycopeptides in the treatment of serious glycopeptide-intermediate *S. aureus* infections.

### INTRODUCTION

GLYCOPEPTIDES ARE CONSIDERED the antibiotics of choice for the treatment of moderate to severe methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections. However, the emergence of *S. aureus* strains with decreased susceptibility to these antibiotics is a matter of concern.<sup>2,3,9,10,12,20,29,35,36</sup> Although the clinical relevance of glycopeptide-intermediate *S. aureus* (GISA) is controversial due to the lack of controlled studies, the poor outcome obtained using vancomycin in some difficult-to-treat infections such as endocarditis or orthopedic surgical infections<sup>1,5</sup> suggests that glycopeptide therapy may be suboptimal in this setting. To date, experimental studies assessing the best treatment of GISA infections have been scarce and inconclusive.<sup>5</sup> Rabbit endocarditis or foreign body infection in rats or mice have been mostly used to study *S. aureus* infections and alternative therapies. These models closely simulate the

characteristics of the infection in humans and provide clear end points that allow statistical comparisons between different therapeutic regimens, but their implementation is complex and they involve a considerable investment of time and money. To evaluate effortlessly the *in vivo* efficacy of different antimicrobial treatments for MRSA and GISA infections, we have developed a modified model of mouse peritonitis, using clinical strains of *S. aureus* with different susceptibilities to  $\beta$ -lactams and glycopeptides. The mouse peritonitis model is straightforward, rapid, and easily reproducible, and has been widely used in testing antibiotics *in vivo*<sup>8,11,13-16,18,23,26</sup>; however, although it has been used for the study of *S. aureus* infections,<sup>11,16,18,23,26</sup> only a few comparative therapeutic studies have been reported. In this particular study, we performed the standardization of the model and assessed the comparative efficacy of monotherapy with cloxacillin, cefotaxime, vancomycin, and teicoplanin against the infection caused by four *S. aureus* strains.

<sup>1</sup>Laboratory of Experimental Infection, Infectious Diseases Service, and <sup>2</sup>Microbiology Department, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain.

This work was presented in part at the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, Illinois, December, 2001 [abstract no. 1653].

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial strains

Four staphylococcal clinical strains with different susceptibilities to glycopeptides and  $\beta$ -lactams were studied. Strains HUB 954 (strain A), HUB 284 (strain B), and HUB 783 (strain C) were isolated in our hospital and strain Mu 50 (ATCC 700699) (strain D) was isolated in Japan in 1997 and described as the first GISA strain.<sup>10</sup> Strain C, belonging to the Iberian clone, had heterogeneous resistance to vancomycin (HRV), growing on 4  $\mu$ g/ml Müller–Hinton plates with a frequency of subpopulations of  $3.6 \times 10^{-6}$  cfu/ml<sup>1</sup>. MICs of strains A, B, C, and D were determined by the standard macrodilution method.<sup>24</sup> Values of MICs are shown in Table 1.

### Inoculum preparation

Colonies from fresh overnight cultures on 5% blood agar plates were resuspended and grown for 4–6 hr at 37°C in TSB medium. Immediately before inoculation, cultures in TSB were centrifuged and resuspended in sterile saline, adjusted to an optical density equal to 0.5 McFarland ( $\sim 10^8$  cfu/ml) and then diluted to the appropriate size. Inoculum sizes from  $10^6$  to  $10^8$  cfu/ml were tested.

### Mouse peritonitis model

The animal studies were approved by the Ethical Committee for Animal Experiments at the University of Barcelona. The mouse peritonitis model was a modified version of a previously described protocol.<sup>8,13,14</sup> Two different mouse strains were tested: Outbred, female, ICR CD-1 mice ( $\sim 8$  weeks;  $\sim 30$  grams) and inbred, female, C57BL/6 mice ( $\sim 6$  weeks;  $\sim 14$ – $16$  grams). Mice were kept 10 to a cage and had food and water *ad libitum*. Inoculation was performed by intraperitoneal (i.p.) injection of 0.5 ml of the inoculum with a 26-gauge syringe. The inoculum consisted of a staphylococcal suspension with 5% (wt/vol) mucin in sterile saline, which enhances the basal virulence of bacteria by inhibiting the local macrophage system, and renders the mice susceptible to infection. In the first stage of the study, the experimental design was standardized, prior to the pharmacokinetic and antibiotic therapy studies. Mouse strain, inoculum size, and virulence of different bacterial strains were evaluated.

TABLE 1. MICs ( $\mu$ G/ML) OF *S. AUREUS* STRAINS USED IN THE STUDY

Antibiotic	MIC ( $\mu$ g/ml) <sup>a</sup>			
	Strain A (MSSA)	Strain B (MRSA)	Strain C (HRV)	Strain D (GISA)
Cloxacillin	0.38	512	1,024	1,024
Cefotaxime	0.5	1,024	1,024	2,048
Vancomycin	1	2	4	8
Teicoplanin	0.5	1	8	8

<sup>a</sup>MSSA, Methicillin-susceptible *S. aureus*; MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*; HRV, heterogeneous resistance to vancomycin; GISA, glycopeptide-intermediate *S. aureus*.

Different time points were tested to study the evolution of the infection and appropriate time points were set for starting therapy. Groups of mice were killed at 4, 8, 16, and 24 hr post-inoculation to obtain blood and peritoneal fluid (PF) samples as described below. Bacterial counts and bacteremia were determined for each mouse and time point. Mortality was also assessed.

### Sample collecting and processing

At each time point, for all experiments, mice were anesthetized i.p. with 40  $\mu$ l of ketamine/xylazine 10:1 (100 mg/kg Ketamine and 10 mg/kg Xylazine) and a peritoneal wash was performed by injecting 2 ml of sterile saline i.p. followed by a 1-min external massage of the abdomen. Immediately, 0.1 ml of blood was withdrawn by cardiac puncture, and animals were then killed by cervical dislocation. The abdomen was opened and 0.2 ml of PF was recovered from the peritoneum using an aseptic technique. PF samples were used to perform direct and 10-fold diluted cultures, which were plated (0.1 ml) on 5% sheep blood TSA plates and incubated for 24 hr at 37°C to determine bacterial counts. The detection limit using this method was  $10^1$  cfu/ml; a value of 0.9 log cfu/ml was assigned to the first sterile culture and 0 to the subsequent ones. To avoid carryover antimicrobial agent interference, the sample was placed on the plate in a single streak down the center and allowed to absorb into the agar until the plate surface appeared dry; the inoculum was then spread over the plate. Plates were incubated overnight at 37°C. Blood cultures were also performed. Immediately after cardiac puncture, blood samples (100  $\mu$ l) were cultured in Trypticase soy broth for 24 hr at 37°C, and then 100  $\mu$ l of the cultured broth were plated in TSA plates and incubated again for 24 hr to assess bacterial growth. Bacteremia was expressed on the basis of blood cultures. Mortality was also expressed qualitatively.

### Pharmacokinetics

Pharmacokinetic studies were performed to select dose regimens that result in serum concentrations similar to those in humans. All antimicrobials were administered subcutaneously. Groups of 20–22 healthy mice were used for each antibiotic pharmacokinetic study. A single weight-adjusted dose of the antibiotic was administered to each animal, following previous pharmacokinetic experimental studies.<sup>15,19,22,27,28,31,37,38</sup>

After antibiotic administration and at different time points, sets of 3 animals were anesthetized i.p. with appropriate doses of ketamine/xylazine, and blood samples ( $\sim 400$ – $500$   $\mu$ l) were obtained by an incision in the periorbital plexus of the eye. Blood was centrifuged and serum stored at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis. Pharmacokinetic and pharmacodynamic (PK and PD) parameters were obtained by a computer-assisted method (PK Functions for Microsoft Excel. J. I. Usansky, A. Desai, and D. Tang-Liu, Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan, Irvine, CA 92606) after determination of antibiotic concentration at the different time points. The parameters calculated were: peak drug concentration in serum ( $C_{\max}$ ), elimination half-life ( $T_{1/2}$ ), area under the concentration–time curve (AUC), inhibitory quotient (IQ;  $\text{IQ} = C_{\max}/\text{MIC}$ ), and time above the MIC of the drug concentration in serum ( $T > \text{MIC}$ ). Based on previous studies,<sup>6,15,16</sup> human data,<sup>7,21,30</sup> and

the PK and PD parameters obtained, doses administered to mice were finally selected: vancomycin 30 mg/kg per 4 hr (daily dose of 180 mg/kg), teicoplanin 40 mg/kg per 24 hr (daily dose of 40 mg/kg), cloxacillin 160 mg/kg per 2 hr (daily dose of 1.6 g/kg), and cefotaxime 200 mg/kg per 2 hr (daily dose of 2 g/kg).

### Therapeutic experiments

Once the experimental design of the animal model was finalized, therapeutic experiments were performed. Four hours after inoculation, antibiotic therapy was initiated (hour 0). Vancomycin, teicoplanin, cloxacillin, or cefotaxime were administered as single regimens using the antibiotic schedule described above. At hour 0, 2 mice were killed and used as controls. Groups of 8 mice were then randomized to different therapeutic regimens ( $n = 6$ ) and control group ( $n = 2$ ). Antibiotic treatment or placebo was administered for 24 hr and mice were killed at that time point to obtain blood and PF samples. Therapeutic experiments were repeated several times to achieve a minimum number of animals in all groups that allowed statistical analysis.

### Antibiotic assays

Antibiotic assays were performed in duplicate. The serum concentrations of vancomycin and teicoplanin were determined by fluorescent polarization immunoassay (FPIA) using a TDx analyzer (ABBOTT CIENTÍFICA, S.A., Diagnostics Division, Costa Brava 13, 28034 Madrid, Spain); minimal detectable concentrations were 2.0  $\mu\text{g/ml}$  for vancomycin and 1.7  $\mu\text{g/ml}$  for teicoplanin. Serum concentrations of cloxacillin and cefotaxime were determined by the disk diffusion bioassay method,<sup>4</sup> using *S. aureus* ATCC 29213 and *E. coli* ATCC 25922, respectively, as test organisms. The minimal detectable concentration was 0.5  $\mu\text{g/ml}$  for cloxacillin and 1  $\mu\text{g/ml}$  for cefotaxime.

### Statistical analysis

All bacterial count data were checked for normal distribution (Kolmogorov–Smirnov test). Analysis of variance (ANOVA) with the Scheffé *post hoc* test was used to analyze multiple comparisons among therapeutic and control groups in every strain. Also comparisons among strains were made by using ANOVA (with Tukey *post hoc* test). The two-tailed Fisher's exact test was used for categorical data (survival, bacteremia). A linear regression was performed to assess correlation between *in vivo* vancomycin efficacy (bacterial count) and vancomycin susceptibility of the four strains (MICs).

## RESULTS

### Standardization of the model

An inoculum of  $10^6$  cfu/ml of *S. aureus* strain A was used to compare mouse strains. The results of the immunocompetent inbred C57BL/6 mouse strain were more homogeneous than those of its outbred counterpart ICR CD-1. Dispersion in bacterial count data obtained at 4 and 24 hr post-inoculation was significantly higher for ICR CD-1, whereas the mean bacterial count was higher for C57BL/6 (Fig. 1A). Bacteremia was higher in the C57BL/6 strain: 100% at 4 and 24 hr post-inoculation

for C57BL/6 and 71% and 80% at 4 and 24 hr, respectively, for ICR CD-1. Mortality at 24 hr post-inoculation was 68% ( $n = 19$ ) for C57BL/6 and 25% ( $n = 8$ ) for ICR CD-1. Inoculums from  $10^6$  to  $10^8$  cfu/ml of *S. aureus* strains A and C were compared in the C57BL/6 mice. The  $10^8$  cfu/ml inoculum was rejected because mortality was 100% less than 16 hr post-inoculation. Bacterial concentration at 4, 8, and 24 hr post-inoculation did not show differences between  $10^6$  and  $10^7$  inoculums or between bacterial strains A and C. Bacteremia at 24 hr post-inoculation was lower in mice infected with a  $10^6$  cfu/ml inoculum (72%) than in those infected with a  $10^7$  cfu/ml inoculum (100%, as mentioned above). Mortality was the parameter that varied most according to inoculum size: 8 hr post-inoculation, it was 72% ( $n = 22$ ) with the  $10^7$  cfu/ml inoculum, but zero ( $n = 8$ ) with the  $10^6$  cfu/ml inoculum. At 24 hr post-inoculation, mortality was 100% ( $n = 13$ ) and 68% ( $n = 19$ ) for  $10^7$  and  $10^6$  cfu/ml inoculums, respectively (Fig. 1B). So the final experimental design for therapeutic studies included C57BL/6 mice and inoculum sizes of  $5 \times 10^6$  to  $5 \times 10^7$  cfu/ml depending on bacterial strain. Therapy was initiated 4 hr post-inoculation to avoid early mortality.

### Pharmacokinetics

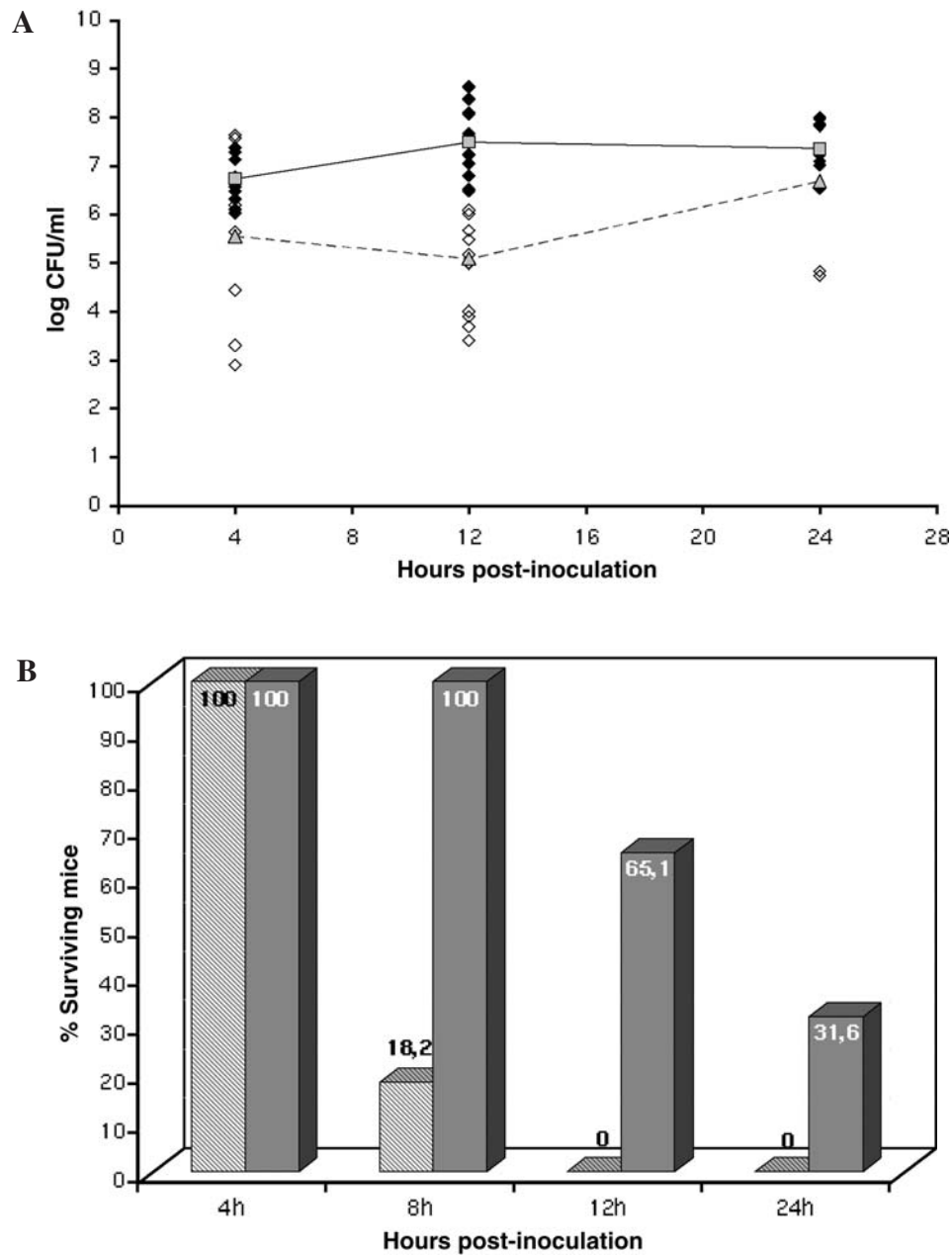
Pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters of antibiotics used in the experiments are shown in Table 2.  $T_{1/2}$  obtained for  $\beta$ -lactams in mice is extremely short, and so the interdose time for these antibiotics was also very short. Although the serum peak was very high for cefotaxime and cloxacillin,  $T > \text{MIC}$  for strains B, C, and D was 0. Only for strain A did the  $T > \text{MIC}$  of  $\beta$ -lactams reach 90–100%. Vancomycin showed a high serum peak and  $T > \text{MIC}$  ranging from 45% to 90% depending on the strain. Finally, teicoplanin achieved a very high AUC ( $>700 \mu\text{g/hr per ml}$ ) due to its high serum peak and long  $T_{1/2}$ .

### Antibiotic efficacy: bacterial clearance in peritoneal fluid, bacteremia, and mortality

Initial bacterial counts in PF (mean  $\pm$  SD), corresponding to hour 0 of the control group for the different strains were:  $7.62 \pm 0.37$  ( $n = 23$ ) for strain A,  $7.05 \pm 0.43$  ( $n = 15$ ) for strain B,  $7.04 \pm 0.55$  ( $n = 28$ ) for strain C, and  $7.02 \pm 0.35$  ( $n = 13$ ) for strain D. Bacteremia in control animals at 0 and 24 hr, expressed as percentage of positive blood cultures, was 100% for all strains. Mortality of control mice at 24 hr differed according to strain: 55% for strain A, 22% for strain B, 62% for strain C, and 21% for strain D.

Bacterial clearance in PF after 24 hr therapy for strains A, B, C, and D is shown in Fig. 2;  $n = 6$  for all therapeutic groups in all strains and  $n \geq 12$  for 24-hr control groups of all strains. In strain A peritonitis, cloxacillin and cefotaxime were bactericidal at 24 hr. Vancomycin and teicoplanin showed slightly lower activity than  $\beta$ -lactams, although the difference was not significant. All therapies had significantly lower bacterial counts than the control group. All treated animals survived. Bacteremia at 24 hr for cloxacillin and cefotaxime treatments was 0%, but 25% for vancomycin and 100% for teicoplanin.

For strain B, vancomycin and teicoplanin achieved a significantly higher reduction in bacterial count than  $\beta$ -lactams, in which the decrease was minimal. There was no statistically sig-



**FIG. 1.** (A) Comparison of data dispersion of bacterial count in PF between ICR (open symbols) and C57BL/6 (solid symbols) mouse strains at different time points. Each symbol represents one mouse. Solid squares and triangles linked by lines represent the respective means of C57BL/6 and ICR. (B) Survival at 4, 8, 12, and 24 hr post-inoculation of C57BL/6 mice with peritonitis due to *S. aureus*. Comparison between 10<sup>7</sup> (hatched columns) and 10<sup>6</sup> (gray columns) cfu/ml inoculums.

nificant difference between the  $\beta$ -lactam and the control group. No mortality was observed in any treatment group. Vancomycin reduced bacteremia at 24 hr to zero and teicoplanin to 50%. Bacteremia fell to 80% with cefotaxime, but remained at 100% at 24 hr with cloxacillin.

In strain C experiments, only vancomycin was able to reduce bacterial counts that differed significantly from those of the control group. It also differed significantly from cefotaxime, which showed an increase in bacterial count at 24 hr, and was totally ineffective. Mortality for cefotaxime-treated mice was 66%,

whereas survival was 100% in the other treatment groups. Cloxacillin and cefotaxime were not able to reduce bacteremia. Teicoplanin decreased bacteremia slightly to 83% and vancomycin reduced it to 33%.

Finally, in strain D experiments, vancomycin showed only moderate activity, lower than that achieved in strain C. Teicoplanin reduced the bacterial count slightly, showing lower activity than cloxacillin, and less activity also than that achieved with strain C. The activity of cloxacillin was slightly higher than that obtained for strains B and C. All treated animals sur-

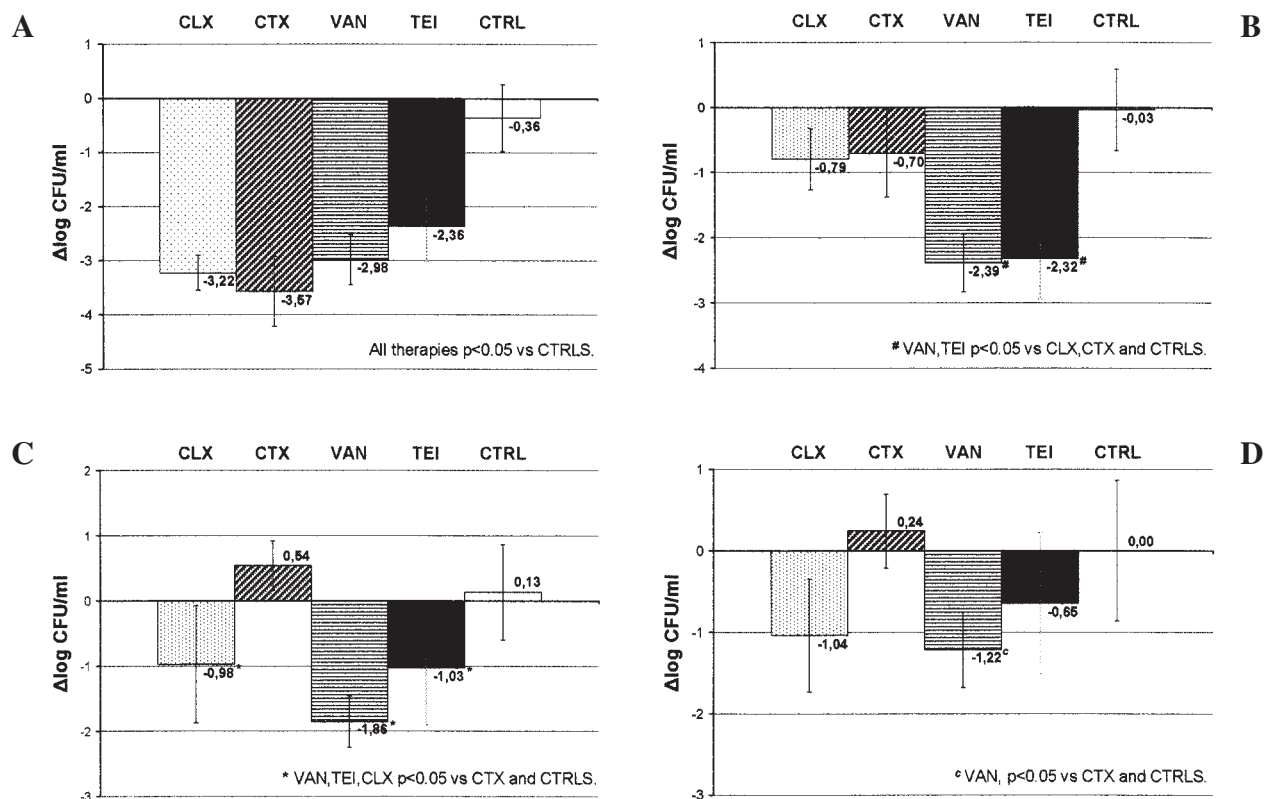


TABLE 2. PHARMACOKINETIC AND PHARMACODYNAMIC PARAMETERS OF ANTIBIOTICS USED IN THE EXPERIMENTS

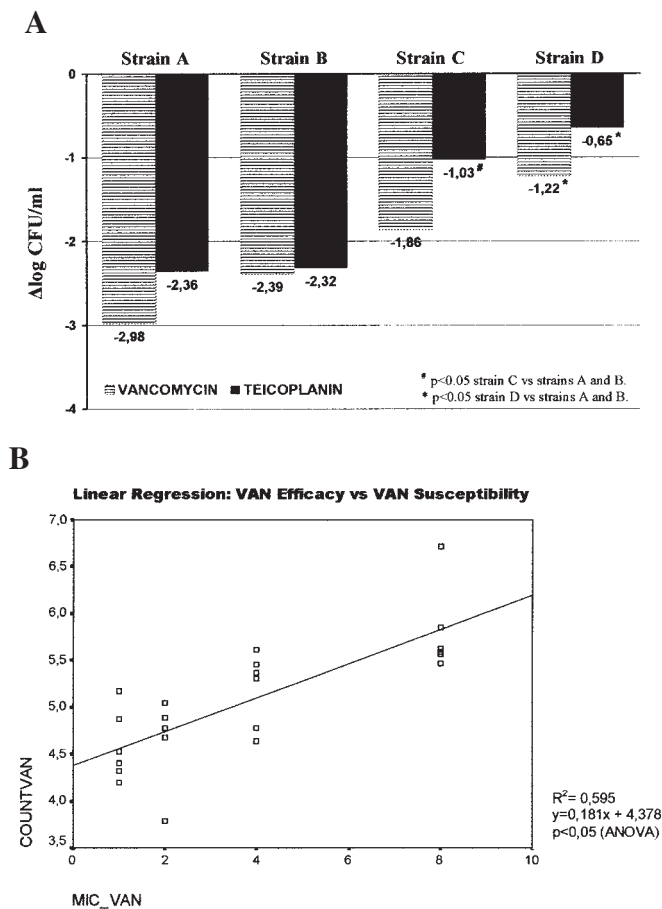
Parameter	Antibiotics			
	Cloxacillin	Cefotaxime	Vancomycin	Teicoplanin
Dose	160 mg/kg	200 mg/kg	30 mg/kg	40 mg/kg
$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	163.5	162.3	44	148
$t_{1/2}$ (hr)	0.35	0.19	0.56	3.26
AUC ( $\mu\text{g/hr per ml}$ )	116.25	76.4	45.4	729
IQ ( $C_{max}/\text{MIC}$ )				
Strain A	430.13	324.68	44.01	296.20
Strain B	<0.64	<0.63	22.01	148.10
Strain C	<0.64	<0.63	11.00	18.51
Strain D	<0.64	<0.63	5.50	18.51
$t > \text{MIC}$ (hr) [%]				
Strain A	3.4 [>100]	1.78 [~80]	3.47 [87]	25.94 [>100]
Strain B	0 [--]	0 [--]	2.91 [73]	22.68 [95]
Strain C	0 [--]	0 [--]	2.35 [59]	12.91 [54]
Strain D	0 [--]	0 [--]	1.79 [48]	12.91 [54]

vived, except those treated with cefotaxime; cefotaxime was ineffective, and presented a mortality of 14% at 24 hr. Vancomycin and cloxacillin reduced bacteremia to 28.6%, whereas teicoplanin and cefotaxime achieved no reduction.

Comparison of glycopeptide therapy between the four strains in the study is shown in Fig. 3; its efficacy was significantly lower with infections due to strains C and D (HRV, GISA) than with infections due to strains A and B.



**FIG. 2.** Bacterial killing rates in peritoneal fluid after 24 hr of therapy for strains A (A), B (B), C (C), and D (D). Results are expressed as differences in mean bacterial counts between the different groups at 24 hr of treatment and controls at 0 hr ( $\Delta \log_{10}$  cfu/ml (24–0 hr). Mean bacterial counts  $\pm$  SD at 24 hr for the different strains were, for strain A: CLX  $4.40 \pm 0.32$ , CTX  $4.05 \pm 0.65$ , VAN  $4.64 \pm 0.46$ , TEI  $5.26 \pm 0.65$ , and Control (CTRL)  $6.95 \pm 0.62$ ; for strain B: CLX  $6.26 \pm 0.47$ , CTX  $6.35 \pm 0.67$ , VAN  $4.66 \pm 0.44$ , TEI  $4.73 \pm 0.63$ , and Control (CTRL)  $7.01 \pm 0.62$ ; for strain C: CLX  $6.08 \pm 0.90$ , CTX  $7.59 \pm 0.38$ , VAN  $5.19 \pm 0.39$ , TEI  $6.02 \pm 0.88$ , and Control (CTRL)  $7.18 \pm 0.73$ ; and for strain D: CLX  $5.98 \pm 0.69$ , CTX  $7.26 \pm 0.45$ , VAN  $5.80 \pm 0.46$ , TEI  $6.37 \pm 0.87$ , and Control (CTRL)  $7.02 \pm 0.75$ .  $n = 6$  for all therapeutic groups and  $n \geq 12$  for control groups at 24 hr.



**FIG. 3.** (A) Comparison of vancomycin and teicoplanin bacterial killing rates at 24 hr among *S. aureus* strains A, B, C, and D. Results are expressed as  $\Delta \log_{10}$  cfu/ml (24–0 hr). Mean bacterial counts  $\pm$  SD at 24 hr for the different strains were: strain A, VAN  $4.64 \pm 0.46$ , TEI  $5.26 \pm 0.65$ ; strain B, VAN  $4.66 \pm 0.44$ , TEI  $4.73 \pm 0.63$ ; strain C, VAN  $5.19 \pm 0.39$ , TEI  $6.02 \pm 0.88$ ; and strain D, VAN  $5.80 \pm 0.46$ , TEI  $6.37 \pm 0.87$ .  $n = 6$  for all groups. (B) Linear regression between vancomycin susceptibility, expressed as the MIC of the different strains (x axis) and vancomycin efficacy, expressed as bacterial counts (log cfu/ml) of vancomycin-treated groups (y axis). Each point represents one mouse.

## DISCUSSION

In general, previous experimental studies with the *S. aureus* mouse peritonitis model have not focused on comparison of different antibiotic regimens. We developed a modified version of the model previously described, evaluating variables involved in the experimental design to obtain a model that was sufficiently sensitive for detecting differences in efficacy among different antibiotic regimens. Results for mean bacterial count, bacterial count dispersion, and bacteremia suggested that the C57BL/6 mouse strain performed better, showing more susceptibility to infection and also providing more homogeneous findings. Among the different parameters used, the bacterial count of peritoneal fluid was the most useful to assess antibiotic efficacy, whereas survival was less sensitive for comparisons between different antibiotics in this model. Therefore, we

sought an inoculum size that could produce a high bacterial count in peritoneal fluid, high bacteremia, and low mortality during the first hours after inoculation. While bacterial counts in peritoneal fluid of 7–8  $\log_{10}$  cfu/ml and 100% bacteremia were found using inoculums of both  $10^6$  and  $10^7$  cfu/ml, mortalities ranged from 21% to 62%, depending on the strain, reflecting the virulence of the model. We therefore used  $5\text{--}9 \times 10^6$  as the inoculum size of choice for strain A and  $1\text{--}5 \times 10^7$  cfu/ml for strains B, C, and D to obtain a similar mortality rate. The mouse peritonitis model was highly reproducible, and it was easier to perform and cheaper than other models used in experimental *S. aureus*-related infections.

Antibiotic dosing regimens were chosen to obtain appropriate PK/PD parameters that simulate those in humans.<sup>6,7,21</sup> Vancomycin at a dose of 30 mg/kg reached a good peak in mice serum (within the range of that in humans), with high IQ values for strains A and B, within the recommended values for strain C and slightly below that value for strain D. This dose was administered every 4 hr (final dose of 180 mg/kg per day) to maintain a good  $T > \text{MIC}$  value, which was high for strains A and B and below 50% of interdose time for strains C and D. Efficacy of vancomycin decreased from strain A to D, showing a good correlation with the MICs of the different strains and the PK/PD parameters obtained. Teicoplanin at 40 mg/kg achieved a serum peak and trough similar to those in humans and, as expected from its long elimination half-life, showed a very high AUC. It could therefore be administered in a single daily dose. Higher IQs than vancomycin, (minimal  $\sim 10$  for strain D) and  $T > \text{MIC}$  from  $>100\%$  for strain A to  $\sim 40\%$  for strain D confirmed an optimal PK/PD profile, similar to that in humans.

Teicoplanin showed good efficacy for strains A and B, but only moderate for strains C and D, in accordance with its pharmacodynamic profile, but with some differences with respect to vancomycin. Vancomycin showed slightly improved activity than teicoplanin in experiments with strains A and B; this better efficacy is more evident for strains C and D although no significant differences were found between the two therapies. Thus, teicoplanin presented better PK/PD profiles than vancomycin, but it was not more effective *in vivo*, as others have already reported.<sup>27,38</sup> It is interesting how this point becomes more apparent with GISA strains, in which teicoplanin therapy was clearly less effective than vancomycin. Recently, Pavie *et al.* have reported the impact of the GISA phenotype when using teicoplanin in therapy for experimental endocarditis,<sup>25</sup> an observation that is in agreement with our results. High levels of protein binding and low penetration in some tissues have been proposed as possible causes for teicoplanin failure in some clinical and experimental infections.<sup>15,16,25</sup>

Cloxacillin and cefotaxime showed bactericidal efficacy in the treatment of peritonitis due to strain A, as was expected from their PK/PD profiles. On the other hand, vancomycin and teicoplanin showed good activity but were not bactericidal at 24 hr. Our results corroborate previous reports that glycopeptides are less bactericidal than  $\beta$ -lactams in the treatment of serious infections such as endocarditis.<sup>5,17,32</sup> Cefotaxime and cloxacillin preserved a slight activity against strain B despite the fact that their  $T > \text{MIC}$  was 0, and, more surprisingly, cloxacillin retained a moderate activity against strains C and D, a finding that was not consistent with its pharmacodynamic pa-

rameters. A partial explanation for this observation may be the reciprocal loss of resistance to oxacillin in some strains as vancomycin MICs increase, as was previously described by Sieradzki and Tomasz.<sup>33,34</sup> On the one hand, they noted that vancomycin-resistant *S. aureus* laboratory-derived mutants reduced  $\beta$ -lactam resistance as increased MICs of the glycopeptides; on the other, they reported that the acquisition of this resistance to vancomycin involves the change from the homogeneous to the heterogeneous methicillin-resistant phenotype. Thus, although hGISA and GISA strains used in our experiment were still highly resistant to methicillin on the basis of their MICs, we can hypothesize that the increasing *in vivo* efficacy of cloxacillin may be due to the emergence of subpopulations less resistant to methicillin, reflecting an early stage in the change from the homogeneous to the heterogeneous methicillin-resistant phenotype.

The efficacy of vancomycin and teicoplanin to treat peritonitis due to strains B, C, and D decreased progressively. Interestingly, percentages of bacteremia increased as killing rates achieved by glycopeptides decreased. Comparison of glycopeptide efficacy among the four strains showed that bactericidal activity decreased significantly with slight increases in glycopeptide MICs (Fig. 3A). The linear regression shown in Fig. 3B underscores this inverse linear relationship between vancomycin MIC and its efficacy *in vivo*. This result suggests that any decrease in glycopeptide susceptibility may have clinical implications, especially in the setting of difficult-to-treat infections such as endocarditis or orthopedic infection, as has been previously described.<sup>1,5</sup> On the other hand, vancomycin keeps significant activity compared to controls in strains C and D (Fig. 3D). Although scarce, this remnant bacteriostatic activity could be relevant in the clinical setting, in which vancomycin can be still useful in relatively mild infections such as nonnecrotizing skin and soft tissue infections, but not in severe infections.

In conclusion, this mouse peritonitis model is straightforward and reproducible. It is able to detect low differences in bacterial killing among antibiotics and also among *S. aureus* strains with different methicillin and glycopeptide susceptibilities. Therefore, this model is particularly useful for comparing the efficacy of antibiotics against these strains. Although the results obtained with experimental infections must be interpreted with caution, our study suggests that heterogeneous resistance to glycopeptides and increases in glycopeptide MICs may be associated with a loss of efficacy in these antibiotics. These findings help to explain previous reports of therapeutical failures with infections due to HRV and GISA strains. This experimental model seems particularly well suited to the task of finding alternative treatments for these infections.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank J.M. Ramón, from Hospital de Bellvitge, for his assistance in statistical analysis. This work was supported by a research grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias FIS 00/0156 from Ministerio de Sanidad, Spain. A. Domenech was supported by a grant from the Universitat de Barcelona, and S. Ribes and A. Montero were supported by grants from the Fun-

dació August Pi i Sunyer. The study was performed without any financial support from laboratories.

#### REFERENCES

1. Ariza, J., M. Pujol, J. Cabo, C. Peña, N. Fernández, J. Liñares, J. Ayats, and F. Gudiol. 1999. Vancomycin in surgical infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin. *Lancet* **353**:1587–1588.
2. Centers for Disease Control and Prevention. 2000. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin-Illinois, 1999. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **48**:1165–1167.
3. Centers for Disease Control and Prevention. 1997. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin-United States, 1997. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **46**:765–766.
4. Chapin-Robertson, K., and S.C. Edberg. 1991. Measurements of antibiotics in human body fluids: techniques and significance. In V. Lorian (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*. Williams and Wilkins, New York, pp. 295–366.
5. Climo, W.M., R.L. Patron, and G.L. Archer. 1999. Combinations of vancomycin and  $\beta$ -lactams are synergistic against staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1747–1753.
6. Craig, W.A. 1998. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin. Infect. Dis.* **26**:1–12.
7. Fekety, R. 1995. Vancomycin and Teicoplanin. In G.L. Mandell, J.E. Bennett, and R. Dolin (ed.), *Principles and practice of infectious diseases*, 4<sup>th</sup> ed. Churchill Livingstone, New York, pp. 346–354.
8. Fridmolt-Moller, N. 1993. The mouse peritonitis model: present and future use. *J. Antimicrob. Chemother.* **31**(Suppl D):55–60.
9. Hiramatsu, K., N. Aritaka, H. Hanaki, S. Kawasaki, Y. Hosoda, S. Hori, Y. Fukuchi, and I. Kobayashi. 1997. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* **350**:1670–1673.
10. Hiramatsu, K., H. Hanaki, T. Ino, K. Yabuta, T. Oguru, and F. C. Tenover. 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* **40**:135–136.
11. Hirschl, A., G. Stanek, and M. Rotter. 1984. Effectiveness of cefamandole against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* in vitro and in experimental infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **13**:429–435.
12. Kim, M. N., C.H. Pai, J.H. Woo, J.S. Ryu, and K. Hiramatsu. 2000. Vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* in Korea. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3879–3881.
13. Knudsen, J.D., N. Fridmolt-Moller, and F. Espersen. 1995. Experimental *Streptococcus pneumoniae* infection in mice for studying correlation of in vitro and in vivo activities of penicillin against pneumococci with various susceptibilities to penicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1253–1258.
14. Knudsen, J.D., N. Fridmolt-Moller, and F. Espersen. 1998. Pharmacodynamics of penicillin are unaffected by bacterial growth phases of *Streptococcus pneumoniae* in the mouse peritonitis model. *J. Antimicrob. Chemother.* **41**:451–459.
15. Knudsen, J.D., K. Fuursted, F. Espersen, and N. Fridmolt-Moller. 1997. Activities of vancomycin and teicoplanin against penicillin-resistant pneumococci in vitro and in vivo and correlation to pharmacokinetic parameters in the mouse peritonitis model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1910–1915.
16. Knudsen, J.D., K. Fuursted, S. Raber, F. Espersen, and N. Fridmolt-Moller. 2000. Pharmacodynamics of glycopeptides in the mouse peritonitis model of *Streptococcus pneumoniae* or *Staphy-*

- lococcus aureus* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 1247–1254.
17. **Levine, D.P., B.S. Fromm, and B.R. Reddy.** 1991. Slow response to vancomycin or vancomycin plus rifampin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Ann. Intern. Med.* **115**:674–680.
  18. **Mannisto, P.T., H. Hanhijarvi, A. Havas, A. Vuorela, H. Kumpulainen, and V. Rauramaa.** 1989. Efficacy of erythromycin acistrate (2'-acetyl erythromycin stearate) and erythromycin stearate in experimental infections in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **250**:1028–1033; erratum in *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **251**: 1246–1247, 1989.
  19. **Mattie, H., L.C. Zhang, E. van Strijen, B.R. Sekh, and A.E. Douwes-Idema.** 1997. Pharmacokinetic and pharmacodynamic models of the antistaphylococcal effects of meropenem and cloxacillin in vitro and in experimental infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2083–2088.
  20. **McManus, J.** 1999. Vancomycin resistant staphylococcus reported in Hong Kong. *Br. Med. J.* **318**:626
  21. **Monroe, S.G., and R. Polk.** 1999. Teicoplanin; vancomycin. In V.L. Yu, T.C. Merigan Jr., and S.L. Barriere (ed.), *Antimicrobial therapy and vaccines*. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, pp. 978–981 and 1007–1018.
  22. **Nagano, R., K. Shibata, T. Naito, A. Fuse, K. Asano, T. Hashizume, and S. Nakagawa.** 1997. Therapeutic efficacy of BO-3482, a novel dithiocarbamate carbapenem, in mice infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2278–2281.
  23. **Nagl, M., P. Hengster, E. Semenitz, and W. Gottardi.** 1999. The postantibiotic effect of N-chlorotaurine on *Staphylococcus aureus*. Application in the mouse peritonitis model. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**:805–809.
  24. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard, 5th ed., NCCLS Document M7-A5, vol. 20, no. 2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA.
  25. **Pavie, J., A. Lefort, M.C. Ploy, L. Massias, F. Chau, L. Garry, F. Denis, and B. Fantin.** 2003. Influence of reduced susceptibility to glycopeptides on activities of vancomycin and teicoplanin against *Staphylococcus aureus* in experimental endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2018–2021.
  26. **Pechere, J.C., B. Marchou, M. Michea-Hamzehpour, and R. Auckenthaler.** 1986. Emergence of resistance after therapy with antibiotics used alone or combined in a murine model. *J. Antimicrob. Chemother.* **17** (Suppl A):11–18.
  27. **Peetermans, W.E., J.J. Hoogeterp, A-M. Hazekamp-van Dokkum, P. van den Broek, and H. Mattie.** 1990. Antistaphylococcal activities of teicoplanin and vancomycin in vitro and in an experimental infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:1869–1874.
  28. **Pitkin, D.H., B.A. Mico, R.D. Sitrin, and L.J. Nisbet.** 1986. Charge and lipophilicity govern the pharmacokinetics of glycopeptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**:440–444.
  29. **Ploy, M.C., C. Grelaud, C. Martin, L. de Lumley, and F. Denis.** 1998. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. *Lancet* **351**:1212.
  30. **Sábada Díaz de Rada, B., J.R. Azanza Perea, E. García Quetglas, and J. Honorato Pérez.** 1998. Glucopéptidos: vancomicina y teicoplanina. In *Medicine 7* (72), Ediciones Doyma S. L., Barcelona, Spain, p. 3329–3336.
  31. **Sauve, C., E. Azoulay-Dupuis, P. Moine, C. Darras-Joly, V. Rieux, C. Carbon, and J. P. Bedos.** 1996. 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.* **40**:2829–2834.
  32. **Small, P.M., and H.F. Chambers.** 1990. Vancomycin for *Staphylococcus aureus* endocarditis in intravenous drug users. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:1227–1231.
  33. **Sieradzki, K., and A. Tomasz.** 1997. Inhibition of cell wall turnover and autolysis by vancomycin in a highly vancomycin-resistant mutant of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **179**:2557–2566.
  34. **Sieradzki, K., and A. Tomasz.** 1999. Inactivation of the methicillin resistance gene *mecA* in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microb Drug Resist* **5**:253–257.
  35. **Sieradzki, K., R.B. Roberts, S.W. Haber, and A. Tomasz.** 1999. The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *N. Engl. J. Med.* **340**:517–523.
  36. **Smith, T.L., M.L. Pearson, K.R. Wilcox, C. Cruz, M.V. Lancaster, B. Robinson-Dunn, F.C. Tenover, M.J. Zervos, J.D. Band, E. White, and W.R. Jarvis.** 1999. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *N. Engl. J. Med.* **340**:493–501.
  37. **Tateda, K., K. Takashima, H. Miyazaki, T. Matsumoto, T. Hatori, and K. Yamaguchi.** 1996. Noncompromised penicillin-resistant pneumococcal pneumonia CBA/J mouse model and comparative efficacies of antibiotics in this model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:1520–1525.
  38. **Torney, H.L., F.J. Balistreri, M.T. Kenny, and W.D. Cheng.** 1991. Comparative therapeutic efficacy of teicoplanin and vancomycin in normal and in neutropenic mice infected with *Staphylococcus haemolyticus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **28**:261–269.

Address reprint requests to:

Dr. Alejandro Domenech  
 Infectious Diseases Service  
 Hospital Universitari de Bellvitge  
 c/Feixa Llarga s/n  
 08907 L'Hospitalet de Llobregat  
 Barcelona, Spain

E-mail: adomenech@bell.uib.es

#### 4. 2. OBJETIVOS TERCERO Y CUARTO

Domenech A, Ribes S, Cabellos C, Taberner F, Tubau F, Dominguez MA, Montero A, Linares J, Ariza J, Gudiol F. "Experimental study on the efficacy of combinations of glycopeptides and beta-lactams against *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides." Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2005; 56:709-16.

3. Estudiar si las combinaciones glucopeptido +  $\beta$ -lactámico presentan actividad sinérgica *in vitro* mediante curvas de letalidad frente a cuatro cepas de *S. aureus* con diferente sensibilidad a glucopeptidos. Estudiar si existe alguna relación entre la sinergia y el grado de resistencia a glucopeptidos.

Las curvas de letalidad con las combinaciones de vancomicina y teicoplanina con ambos  $\beta$ -lactámicos a las concentraciones más relevantes se resumen en la figura 1 de este trabajo. El efecto sinérgico fue más evidente con las cepas A (MSSA) y D (GISA), frente a las que todas las combinaciones a la mayoría de concentraciones fueron sinérgicas y bactericidas. Por otro lado, sólo algunas combinaciones, y a determinadas concentraciones tuvieron un efecto sinérgico frente a las cepas B (MRSA) y C (hGISA). Frente a estas cepas, las combinaciones con oxacilina fueron globalmente más activas, aunque no se observó en ningún caso efecto bactericida.

4. Estudiar si existe diferencia entre la actividad *in vivo* de la monoterapia con glucopeptidos y una combinación glucopeptido +  $\beta$ -lactámico en el tratamiento de la peritonitis experimental producida por *S. aureus* con diferentes grados de sensibilidad a los glucopeptidos.

Este fue el objetivo principal del artículo. Los resultados de la eficacia terapéutica de las combinaciones *in vivo* se muestran en la tabla 3 de este artículo. Excepto alguna combinación con teicoplanina que mejoró ligeramente la actividad de ésta en solitario (en cepas A y D), globalmente ninguna combinación supuso una mejora significativa en la eficacia respecto al tratamiento con glucopeptidos en monoterapia. En general, los porcentajes de bacteriemia fueron iguales o superiores que los observados para vancomicina en solitario, especialmente con las cepas C y D (tabla 2, art.). La comparación de la eficacia de la combinación de vancomicina y

cloxacilina en la infección por las diferentes cepas mostró el mismo perfil que vancomicina en solitario, esto es, pérdida de eficacia significativa frente a las cepas menos sensibles a gluco péptidos (fig.2, art.). El análisis farmacodinámico de la combinación entre vancomicina y cloxacilina mediante un modelo de regresión múltiple mostró cómo sólo el parámetro farmacodinámico asociado a vancomicina (AUC/CMI) predijo de la eficacia de la combinación, mientras que el parámetro asociado a cloxacilina no tuvo ninguna influencia en el modelo. La predicción de la eficacia se correlacionó moderadamente bien ( $R^2 = 0,5207$ ) con la eficacia observada y la recta inferida se aproximó a la función  $Y=X$ , lo que se interpreta como ausencia de efecto sinérgico o aditivo (fig. 3, art.; ver también discusión).

La siguiente figura (fig. 4.4) resume gráficamente la eficacia terapéutica con monoterapias y combinaciones en el tratamiento de la peritonitis producida por las cuatro cepas de *S. aureus* implicadas en el estudio.

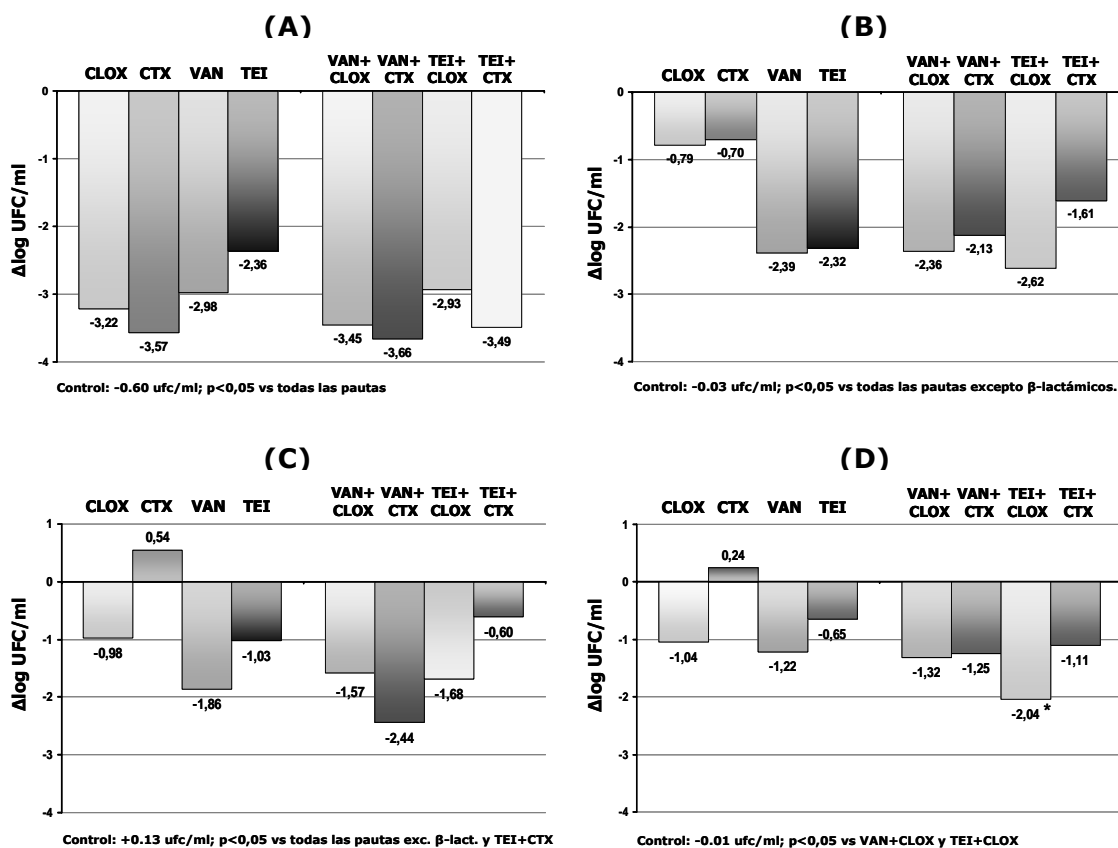


Figura 4.4. Descenso en el recuento bacteriano en el LP ( $\Delta\log$  de UFC/ml) tras 24h de tratamiento con las diferentes pautas antibióticas. Cepas (A), (B), (C) y (D).

## Experimental study on the efficacy of combinations of glycopeptides and $\beta$ -lactams against *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides

Alejandro Domenech<sup>1\*</sup>, Sandra Ribes<sup>1</sup>, Carmen Cabellos<sup>1</sup>, Ferran Taberner<sup>1</sup>, Fe Tubau<sup>2</sup>, M. Angeles Domínguez<sup>2</sup>, Abelardo Montero<sup>1</sup>, Josefina Liñares<sup>2</sup>, Javier Ariza<sup>1</sup> and Francesc Gudiol<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Experimental Infection, Infectious Diseases Service, Hospital Universitari de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Microbiology Department, IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Received 24 December 2004; returned 20 February 2005; revised 1 July 2005; accepted 28 July 2005

**Objectives:** The combination of glycopeptides and  $\beta$ -lactams has been proposed as an alternative therapy against infections due to *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides, though its role is still controversial. Our aim was to evaluate the efficacy (decrease in bacterial concentration after 24 h therapy) of these combinations both *in vitro* and *in vivo*.

**Methods:** Four strains of *S. aureus* with different glycopeptide susceptibility (MICs of vancomycin from 1 to 8 mg/L) were used. *In vitro* experiments were performed by means of time–kill curves while we used the mouse peritonitis model for *in vivo* evaluation.

**Results:** Combinations of glycopeptides and  $\beta$ -lactams showed synergy in *in vitro* time–kill curves against the four staphylococcal strains, the highest efficacy being detected against the glycopeptide-intermediate *S. aureus* (GISA) strain (MIC = 8 mg/L) ( $\Delta\log$  24 h =  $-3.19$  cfu/mL for vancomycin at  $1/2 \times$  MIC and oxacillin at  $1/64 \times$  MIC versus  $-0.56$  cfu/mL for vancomycin alone at  $1/2 \times$  MIC). On the other hand, no significant increase in efficacy was observed *in vivo* in the experimental model. The efficacy of the combinations decreased in correlation to the decreasing susceptibility of the strains to glycopeptides, showing only residual activity against the GISA strain ( $\Delta\log$  24 h =  $-1.42$  cfu/mL for vancomycin and cloxacillin versus  $-1.22$  cfu/mL for vancomycin).

**Conclusions:** In the *in vivo* setting we were unable to demonstrate the synergism between glycopeptides and  $\beta$ -lactams observed *in vitro*; nor did combinations show antagonism against any of the strains. Though the usefulness of these combinations cannot be totally ruled out in highly specific clinical conditions, it seems unlikely that they will provide a serious therapeutic alternative in most hGISA and GISA infections in the coming years.

Keywords: vancomycin, animal models, GISA, heterogeneous resistance

### Introduction

In recent years, clinical isolates of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides have been described worldwide,<sup>1–12</sup> including glycopeptide-intermediate resistant strains (GISA) (MICs of vancomycin 8–16 mg/L) and strains with heterogeneous resistance to vancomycin (hGISA) (MICs of vancomycin <8 mg/L). The clinical relevance of this resistance is under debate, since glycopeptide MICs for hVISA and GISA isolates, ranging from 4 to 16 mg/L, remain below achievable levels in

serum. Nevertheless, diverse experimental studies have found the activity of vancomycin and teicoplanin against GISA isolates to be reduced<sup>9,13,14</sup> and some clinical data also indicate that vancomycin therapy may be sub-optimal in the setting of deep-seated and difficult-to-treat infections caused by these strains, such as endocarditis or prosthetic joint infections.<sup>1,9,11</sup> A few new antimicrobial agents such as linezolid and quinupristin/dalfopristin (Synercid) and some antibiotic combinations have been suggested as alternative regimens against GISA and hGISA strains, but the treatment of these infections continues to be an issue of great concern.

\*Corresponding author: Tel: +34-934035805/34-932607637; Fax: +34-932607625; E-mail: adomenech@ub.edu

Among these antimicrobial strategies, the combination of glycopeptides and  $\beta$ -lactams has been reported to be a promising alternative to glycopeptide monotherapy.<sup>13,15,16</sup> It was based on the initial observation of Sieradzki *et al.*<sup>17,18</sup> that *in vitro* highly vancomycin-resistant strains recover  $\beta$ -lactam susceptibility and that combinations of glycopeptides and  $\beta$ -lactams show additive or synergistic effects against vancomycin-susceptible methicillin-resistant *S. aureus* (VS-MRSA), hGISA and GISA isolates.<sup>13,15,16,19–23</sup> Climo *et al.*<sup>13</sup> confirmed this phenomenon of synergism between vancomycin and  $\beta$ -lactams in an *in vivo* experimental model of endocarditis caused by GISA isolates in rabbits. However, contradictory observations have been recorded in subsequent *in vitro* studies including an antagonistic effect of these combinations at particular sub-MIC  $\beta$ -lactam concentrations or a false synergy caused by inappropriate testing methods.<sup>21,24–26</sup> What is more, no further *in vivo* evidence has confirmed this synergistic effect.

In order to broaden our knowledge of the role of the combinations of glycopeptides and  $\beta$ -lactams in the therapy of hGISA and GISA infections, we evaluated their activity *in vitro* by means of time–kill curves and studied their efficacy *in vivo* with a mouse model of peritonitis using four *S. aureus* strains with different susceptibilities to glycopeptides, including vancomycin-susceptible methicillin-susceptible *S. aureus* (VS-MSSA), VS-MRSA, hGISA and GISA isolates.

## Materials and methods

### Bacterial strains and determination of MICs

Four clinical strains of *S. aureus* with variable degrees of susceptibility to glycopeptides were included in *in vitro* and *in vivo* studies. Strain A (HUB 954), VS-MSSA; strain B (HUB 284), VS-MRSA; strain C (HUB 783) hGISA, belonging to the Iberian clone, growing on 4 mg/L vancomycin Mueller–Hinton plates with a frequency of sub-populations of  $3.6 \times 10^{-6}$  cfu/mL, as previously described<sup>1</sup> (this strain was equivalent to widely described Mu-3 heteroresistant strain); and strain D (Mu50, ATCC 700699), GISA. Strains A, B and C were isolated in our hospital, and strain D, reported as the first GISA strain by Hiramatsu *et al.*<sup>6</sup> was isolated in Japan in 1997. MICs to vancomycin, teicoplanin, cloxacillin and cefotaxime of the four strains were determined by macrodilution according to NCCLS guidelines<sup>27</sup> (Table 1).

**Table 1.** MICs (mg/L) for *Staphylococcus aureus* strains used in the study

Antibiotic	MIC (mg/L)			
	strain A (VS-MSSA)	strain B (VS-MRSA)	strain C (hGISA)	strain D (GISA)
Cloxacillin	0.38	512	1024	1024
Cefotaxime	0.5	1024	1024	2048
Vancomycin	1	2	4	8
Teicoplanin	0.5	1	8	16

VS, vancomycin-susceptible; MSSA, methicillin-susceptible *S. aureus*; MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*; hGISA, *S. aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin; GISA, glycopeptide-intermediate *S. aureus*.

### Time–kill studies

Time–kill curves were performed according to NCCLS guidelines.<sup>28</sup> Bactericidal activity was evaluated by determining the killing rate for a bacterial isolate by an antimicrobial agent. Aliquots of *S. aureus* were cultured at 37°C in Mueller–Hinton broth tubes at an inoculum size of  $10^5$  cfu/mL and antibiotics were then added at chosen concentrations. For each strain, vancomycin, teicoplanin, oxacillin and cefotaxime were tested for a range of concentrations according to their MICs and their achievable concentration in human serum. Glycopeptides were tested at concentrations of  $2 \times$  MIC,  $1 \times$  MIC and  $1/2 \times$  MIC while  $\beta$ -lactams at 2, 1, 1/4, 1/8 and  $1/16 \times$  MIC for strain A, and 1, 1/4, 1/16, 1/64 and  $1/128 \times$  MIC for strains B, C and D. Growth control was assessed with an extra tube without antibiotic in all experiments. At 0, 4, 8 and 24 h of incubation, aliquots of 100  $\mu$ L were taken from each tube to perform direct and 10-fold dilutions, which were cultured on trypticase soy agar (TSA) plates at 37°C for 24 h. Quantitative results were then obtained by performing bacterial counts. To avoid carryover antimicrobial agent interference, the sample was placed on the plate in a single streak down the centre, allowed to absorb into the agar until the plate surface appeared dry, and the inoculum was then spread over the plate. Synergy of a combination of antibiotics was defined as a decrease of at least  $2 \log_{10}$  cfu/mL at 24 h compared with the single most active agent. An antibiotic or combination was considered bactericidal when it obtained a reduction of at least  $3 \log_{10}$  cfu/mL.

### Preparation of inoculum used in mice peritonitis

Colonies from fresh overnight cultures on 5% blood agar plates were resuspended and grown for 4–6 h at 37°C in trypticase soy broth (TSB). Immediately before inoculation, cultures in TSB were centrifuged and resuspended in sterile saline, adjusted to an optical density of 0.5 McFarland ( $\sim 10^8$  cfu/mL) and then diluted to the appropriate size. Inoculum sizes from  $5 \times 10^6$  to  $5 \times 10^7$  cfu/mL were finally used in mice experiments.

### Mouse peritonitis model and sample processing

The animal studies were approved by the Ethics Committee for Animal Experiments at the University of Barcelona. The model was based on a previously described protocol.<sup>14,29,30</sup> Inbred, female, C57BL/6 mice ( $\sim 6$  weeks;  $\sim 14$ – $16$  g) were used (Harlan Int. Ibérica, S.A., Barcelona, Spain). Mice were kept ten to a cage and they had food and water *ad libitum*. After a 1 week quarantine, inoculation was performed by intraperitoneal injection of 0.5 mL of the inoculum via a 26-gauge syringe. The inoculum consisted of a  $5 \times 10^6$  to  $5 \times 10^7$  cfu/mL staphylococcal suspension with 5% (w/v) mucin in sterile saline. In every set of experiments, 4 h after inoculation a group of mice were killed as controls (total  $n \geq 13$ ) and antibiotic therapy was initiated (Hour 0). The rest of the mice were randomized to different therapeutic regimens (total  $n \geq 6$  per therapy) or the control group (total  $n \geq 12$ ). Antibiotic treatment or placebo was administered for 24 h following schedules described below. A set of 48 h therapy experiments, using vancomycin alone and combined with cloxacillin, were performed with strains C and D to determine if a more prolonged treatment period may involve changes in the efficacy of monotherapies or combinations. At each time point (0, 24 and 48 h), mice were anaesthetized intraperitoneally with 30  $\mu$ L of ketamine/xylazine (5:1) and peritoneal washes were performed by injecting 2 mL of sterile saline intraperitoneally followed by a 1 min external massage of the abdomen. Immediately, 0.1 mL of blood was withdrawn by cardiac puncture to perform qualitative blood cultures and animals were then killed by cervical dislocation. Next, the abdomen was opened using an aseptic technique and 0.2 mL of peritoneal fluid (PF) was recovered. PF samples were diluted and plated (0.1 mL) on 5% blood TSA plates to perform direct



and 10-fold dilution cultures. To avoid carryover antimicrobial agent interference, the sample was placed on the plate in a single streak down the centre, allowed to absorb into the agar until the plate surface appeared dry, and the inoculum was then spread over the plate. The detection limit using this method was  $10^1$  cfu/mL. In order to assess bacteraemia, blood samples from cardiac puncture were grown in TSB at 37°C for 24 h and then 100  $\mu$ L of broth was cultured on TSA plates (37°C for 24 h) to check for *S. aureus* growth. Mortality of control and therapeutic groups was recorded at 24 h of therapy.

Efficacy of an antibiotic therapy was defined as the decrease in the number of cfu ( $\Delta$ log cfu/mL) in PF after 24 h of therapy.

### Therapeutic experiments

Pharmacokinetic studies to select the appropriate dose regimens resulting in serum concentrations similar to those in humans were described in a previous study.<sup>14</sup> All antimicrobials were administered subcutaneously. Mice infected with either strain A, B, C, or D were randomized to receive vancomycin (30 mg/kg every 4 h) or teicoplanin (40 mg/kg in a single daily dose) as monotherapy or in combination with cloxacillin (160 mg/kg every 2 h) or cefotaxime (200 mg/kg every 2 h) or control group with saline serum as placebo. Average peak and trough levels of vancomycin and teicoplanin in serum were 44 and 0.6 mg/L (at 15 min and 4 h), and 148 and 1.15 mg/L (at 1 and 24 h), respectively; average peak and trough levels of cloxacillin and cefotaxime were 163 and 0.4 mg/L (at 15 min and 2 h), and 162 and 0.2 mg/L (at 10 min and 2 h), respectively. Results of experiments regarding monotherapies were previously reported.<sup>14</sup>

The possibility of a change in MIC for strains C and D (hGISA and GISA) to glycopeptides by selection of vancomycin or teicoplanin-resistant sub-populations during experimental therapy was investigated by performing a new determination of MIC on the colonies growing in PF at 24 h of therapy.

### Pharmacodynamic analysis

We evaluated the efficacy of the particular combination of vancomycin and cloxacillin according to the method described by Mouton *et al.*<sup>31</sup> We calculated the pharmacodynamic indices (PDIs) for vancomycin and cloxacillin on the basis of previously reported pharmacokinetic studies.<sup>14</sup> Different PDIs were based on different susceptibilities of the strains involved in the study. The efficacy of the single therapy was then described as a function of the PDI most appropriate for each agent using a linear regression model. For cloxacillin  $t < \text{MIC}$  is widely accepted as the best PDI to predict efficacy; for vancomycin, we found that AUC/MIC was the parameter with the best correlation with efficacy (a multiple regression analysis with different PDIs was used to determine which was the more appropriate PDI to predict efficacy of the single therapy; data not shown). Alternatively, a multiple regression analysis was used to determine the contribution of each PDI to the efficacy of the combination therapy. A prediction of the efficacy of the combination was then calculated using the linear regression models for both single-agent therapies by means of a linear combination, and the predicted values were compared with the experimentally observed values.

### Statistics

Analysis of variance (ANOVA) with Scheffé *post hoc* test was used to analyse multiple bacterial count comparisons between therapeutic and control groups. Comparisons between strains were made by using ANOVA (with Tukey *post hoc* test). Two-tailed Fisher's exact test was used for categorical data (survival, bacteraemia). A *P* value of  $<0.05$  was considered statistically significant for all tests. SPSS

statistical program was used for calculation of the linear and multiple regression models of the pharmacodynamic analysis.

## Results

### *In vitro* studies: time–kill curves

The most significant time–kill curves of the four strains involved in the study are shown in Figure 1.

**Strain A.** Vancomycin alone showed bactericidal activity at  $2 \times \text{MIC}$  concentration and bacteriostatic activity at  $1 \times \text{MIC}$ , while teicoplanin achieved only bacteriostatic activity at concentrations above the MIC and did not reduce bacterial count at 24 h at  $1 \times \text{MIC}$ . Cefotaxime alone was bactericidal at  $2 \times$  and  $1 \times \text{MIC}$ , while oxacillin was bactericidal only at  $2 \times \text{MIC}$ . The addition of both  $\beta$ -lactams at  $2 \times$ ,  $1 \times$  and  $1/2 \times \text{MIC}$  to vancomycin at concentrations above the MIC slightly improve its activity, but without a synergistic effect. Combination of teicoplanin at concentrations above the MIC with cefotaxime at  $2 \times$  and  $1 \times \text{MIC}$  reached bactericidal activity because of the  $\beta$ -lactam activity, while the addition of oxacillin at those concentrations did not. Synergy was observed with the addition of both  $\beta$ -lactams at  $1/2 \times$  and  $1/4 \times \text{MIC}$ . Combinations of vancomycin or teicoplanin at  $1/2 \times \text{MIC}$  with cefotaxime or oxacillin at sub-MIC concentrations showed synergy; with cefotaxime at  $1/2 \times$  or  $1/4 \times \text{MIC}$ , combinations were bactericidal.

**Strain B.** Glycopeptides achieved a minimum bacterial count reduction of 1–2 log cfu/mL at 24 h when tested alone at concentrations above the MIC (slightly better for vancomycin), their activity being only bacteriostatic. Cefotaxime was bactericidal at  $1 \times \text{MIC}$ , showing better activity than oxacillin, which was not effective at that concentration. The addition of the  $\beta$ -lactams at  $1 \times \text{MIC}$  to vancomycin at concentrations above the MIC did not improve the activity of the glycopeptide. On the other hand, the combination of teicoplanin at  $1 \times \text{MIC}$  with oxacillin at  $1 \times \text{MIC}$  showed additive effect, without being bactericidal; the addition of cefotaxime did not improve the activity achieved by the  $\beta$ -lactam alone. Combinations of teicoplanin at  $1/2 \times$  and  $1/4 \times \text{MIC}$  with both cefotaxime and oxacillin at sub-MIC concentrations up to  $1/64 \times \text{MIC}$  were synergistic; since the activity of vancomycin alone at  $1/2 \times \text{MIC}$  remained moderate, only combinations with vancomycin at  $1/4 \times \text{MIC}$  showed synergism. All combinations reached only bacteriostatic activity.

**Strain C.** Vancomycin and teicoplanin alone were bacteriostatic at concentrations above the MIC and retained a slight activity at  $1/2 \times \text{MIC}$ , showing a similar profile to strain B curves. Oxacillin and cefotaxime were only bacteriostatic at  $1 \times \text{MIC}$  concentration when tested alone. Combination of both  $\beta$ -lactams at that concentration with glycopeptides above the MIC did not result in any improvement. Combinations of both glycopeptides at  $1/4 \times \text{MIC}$  concentrations with oxacillin or cefotaxime showed synergism for a range of concentrations up to  $1/64 \times \text{MIC}$  for both  $\beta$ -lactams; only the ones with vancomycin at  $1/4 \times \text{MIC}$  and oxacillin at  $1/4 \times$  and  $1/16 \times \text{MIC}$  were bactericidal.

**Strain D.** Vancomycin and teicoplanin were on the threshold of bactericidal activity when tested alone at concentration of  $2 \times \text{MIC}$ ; their activity was better than against strains B and C. Oxacillin and

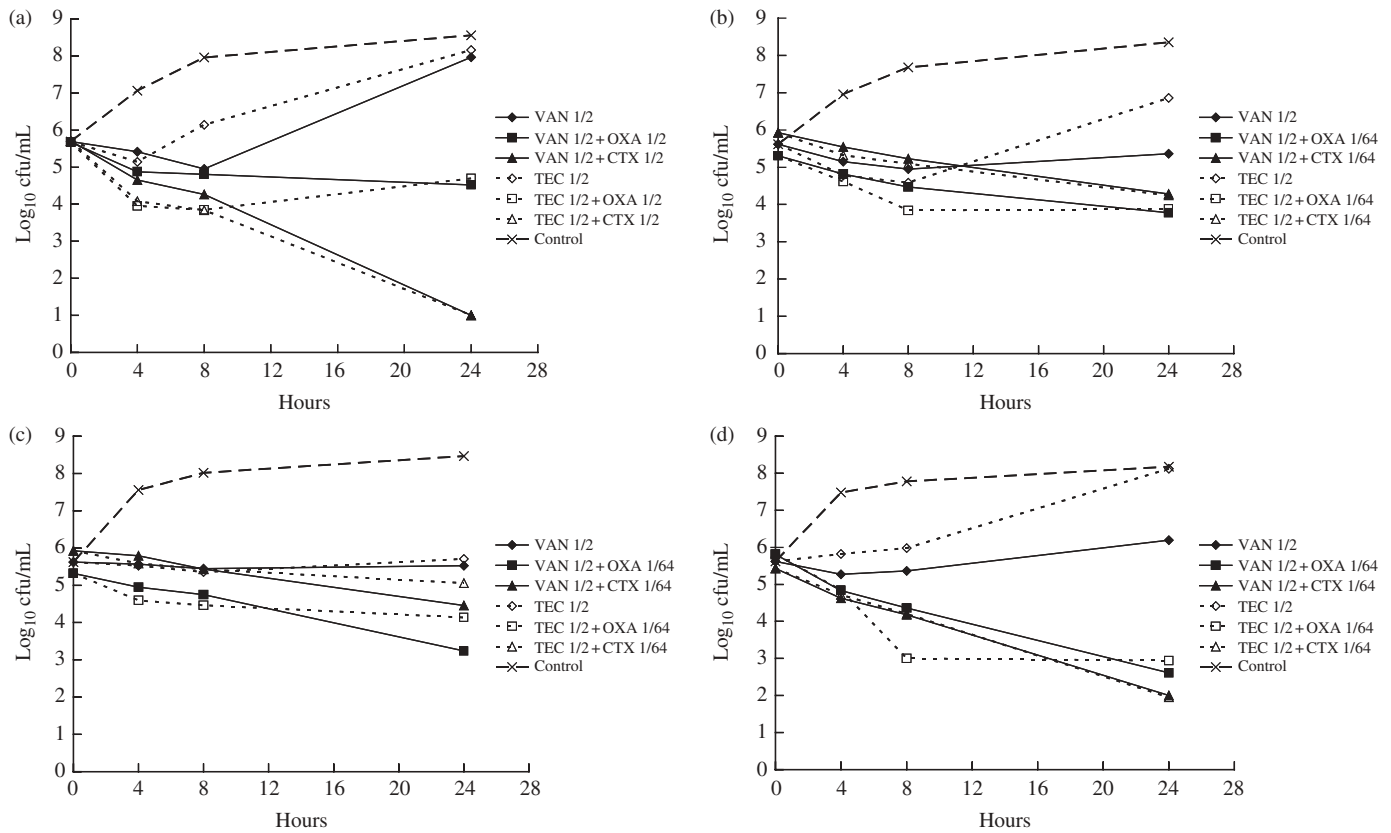


Figure 1. (a–d) Time–kill curves for strains A, B, C and D, respectively. OXA, oxacillin; CTX, cefotaxime; VAN, vancomycin; TEC, teicoplanin.

cefotaxime tested alone at concentrations above the MIC were also in the range of bactericidal activity, but without reaching a 3 log cfu/mL decrease. The addition of  $\beta$ -lactams at  $1 \times$  MIC to vancomycin at concentrations above the MIC was additive and almost synergistic; their addition to teicoplanin at concentrations above the MIC reached a clear synergistic and bactericidal effect. Combinations of both glycopeptides at concentrations of  $1/2 \times$  and  $1/4 \times$  MIC with cefotaxime and oxacillin at sub-MIC concentrations up to  $1/64$  (even at  $1/128 \times$  MIC for oxacillin) were synergistic and bactericidal in all cases. Combinations were more active against this strain.

*Therapeutic efficacy in the mouse peritonitis model*

**Mortality and bacteraemia by strains.** Mortality of control mice at 24 h differed according to strain: 55% in strain A, 22% in strain B, 62% in strain C and 21% in strain D, reflecting the virulence of the model. At 48 h, mortality was 50% for strain C and 17% for strain D. On the other hand, mortality was 0% in all therapeutic groups with all strains.

Bacteraemia of control and therapeutic groups after 24 h therapy for all strains is shown in Table 2.

**Bacterial counts in PF by strains.** Bacterial count in PF (expressed as mean cfu/mL  $\pm$  SD) of control animals at Hour 0 were:  $7.62 \pm 0.37$  ( $n = 23$ ) for strain A;  $7.05 \pm 0.43$  ( $n = 15$ ) for strain B;  $7.04 \pm 0.55$  ( $n = 27$ ) for strain C and  $7.02 \pm 0.35$  ( $n = 13$ ) for strain D experiments. Table 3 shows bacterial counts in PF at 24 h, after treatment with different therapies or without treatment (control

Table 2. Bacteraemia of infected mice after 24 h of treatment for therapeutic and control groups

Therapy	% Positive blood cultures			
	strain A (VS-MSSA)	strain B (VS-MRSA)	strain C (hGISA)	strain D (GISA)
Control 24 h	100	100	100	100
VAN	25	0	33	33
TEC	100	50	100	100
CLO	0	100	100	33
CTX	0	66	100	100
VAN + CLO	0	0	100	80
TEC + CLO	0	0	100	80
VAN + CTX	0	0	100	80
TEC + CTX	0	100	100	80

VAN, vancomycin; TEC, teicoplanin; CLO, cloxacillin; CTX, cefotaxime. Data are expressed as percentages of positive blood cultures ( $n \geq 6$ ). Bacteraemia of control animals at the start of therapy (Hour 0) was 100% for all strains.

group). Efficacy of an antibiotic therapy was defined as the decrease in the number of cfu ( $\Delta$ log cfu/mL) in PF between 0 and 24 h.

The MICs for these colonies were identical to those of the initial isolates. For strain A (VS-MSSA), no statistical differences were found between single or combined therapies, with the exception of

## Glycopeptide and $\beta$ -lactam combination and *S. aureus*

**Table 3.** Bacterial count in peritoneal fluid (PF) for therapeutic and control groups after 24 h therapy

Therapy <sup>a</sup>	PF bacterial count $\pm$ SD (log cfu/mL) [n]			
	strain A (VS-MSSA)	strain B (VS-MRSA)	strain C (hGISA)	strain D (GISA)
Control 24 h	6.95 $\pm$ 0.62 <sup>b</sup> [13]	7.01 $\pm$ 0.62 [15]	7.18 $\pm$ 0.73 [14]	7.02 $\pm$ 0.75 [12]
VAN	4.64 $\pm$ 0.46 [6]	4.66 $\pm$ 0.44 <sup>c</sup> [6]	5.19 $\pm$ 0.39 <sup>d</sup> [6]	5.80 $\pm$ 0.46 [6]
TEC	5.26 $\pm$ 0.65 [6]	4.73 $\pm$ 0.63 <sup>c</sup> [6]	6.02 $\pm$ 0.88 <sup>d</sup> [7]	6.37 $\pm$ 0.87 [6]
CLO	4.40 $\pm$ 0.32 [6]	6.26 $\pm$ 0.47 [6]	6.08 $\pm$ 0.90 [6]	5.98 $\pm$ 0.69 [6]
CTX	4.05 $\pm$ 0.65 [6]	6.35 $\pm$ 0.67 [6]	7.59 $\pm$ 0.38 [6]	7.26 $\pm$ 0.45 [6]
VAN+CLO	4.17 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup> [6]	4.69 $\pm$ 0.60 <sup>c</sup> [6]	5.48 $\pm$ 0.55 <sup>d</sup> [6]	5.70 $\pm$ 0.40 <sup>f</sup> [7]
TEC+CLO	4.69 $\pm$ 0.34 [6]	4.43 $\pm$ 0.27 <sup>c</sup> [6]	5.37 $\pm$ 0.60 <sup>d</sup> [6]	4.98 $\pm$ 0.33 <sup>f,g</sup> [6]
VAN+CTX	3.96 $\pm$ 0.25 <sup>c</sup> [6]	4.92 $\pm$ 0.47 <sup>c</sup> [6]	4.61 $\pm$ 0.79 <sup>d</sup> [6]	5.77 $\pm$ 0.37 [7]
TEC+CTX	4.13 $\pm$ 0.20 <sup>e</sup> [5]	5.44 $\pm$ 0.36 <sup>c</sup> [5]	6.45 $\pm$ 0.43 [7]	5.91 $\pm$ 0.68 [7]

VAN, vancomycin; TEC, teicoplanin; CLO, cloxacillin; CTX, cefotaxime.

<sup>a</sup>Data regarding monotherapies have been previously reported.<sup>8</sup>

<sup>b</sup>All therapies  $P < 0.05$  versus control group.

<sup>c</sup> $P < 0.05$  versus control.

<sup>d</sup> $P < 0.05$  versus control.

<sup>e</sup> $P < 0.05$  versus TEC.

<sup>f</sup> $P < 0.05$  versus control.

<sup>g</sup> $P < 0.05$  versus TEC.

teicoplanin, which was statistically less efficacious than most combinations. In strain B (VS-MRSA) and strain C (hGISA) experiments, as expected,  $\beta$ -lactams were not effective; combinations of glycopeptides and  $\beta$ -lactams did not improve the efficacy of single therapy with vancomycin or teicoplanin. Against strain D (GISA) both vancomycin and teicoplanin showed lower efficacy than against the rest. Only combinations with cloxacillin reached statistically significant differences when compared with controls. Interestingly, teicoplanin–cloxacillin combination was significantly more efficacious than teicoplanin alone.

*In vivo* efficacy after 24 h of therapy with vancomycin alone or combined with cloxacillin against the four *S. aureus* strains is compared in Figure 2(a), showing a significant decrease for both single and combined therapies when glycopeptide resistance increased. Efficacy of monotherapies and combinations increased from 24 to 48 h of therapy for strains C and D, but no significant differences were observed at this point between monotherapy and the combined treatment (Figure 2b). Multiple regression analysis of the efficacy of the combination therapy as a function of PDIs for vancomycin and cloxacillin showed that only the AUC/MIC for vancomycin could explain that efficacy, being non-significant for the contribution of  $t > \text{MIC}$  cloxacillin to the model and confirming that the addition of the  $\beta$ -lactam did not mean any synergistic nor additive effect; thus  $R^2$  for the model including both antibiotics PDIs was 0.573, while partial  $R^2$  including only AUC/MIC for vancomycin was 0.569. Prediction of efficacy of the combination was closer to the observed efficacy, with a moderate correlation (Figure 3).

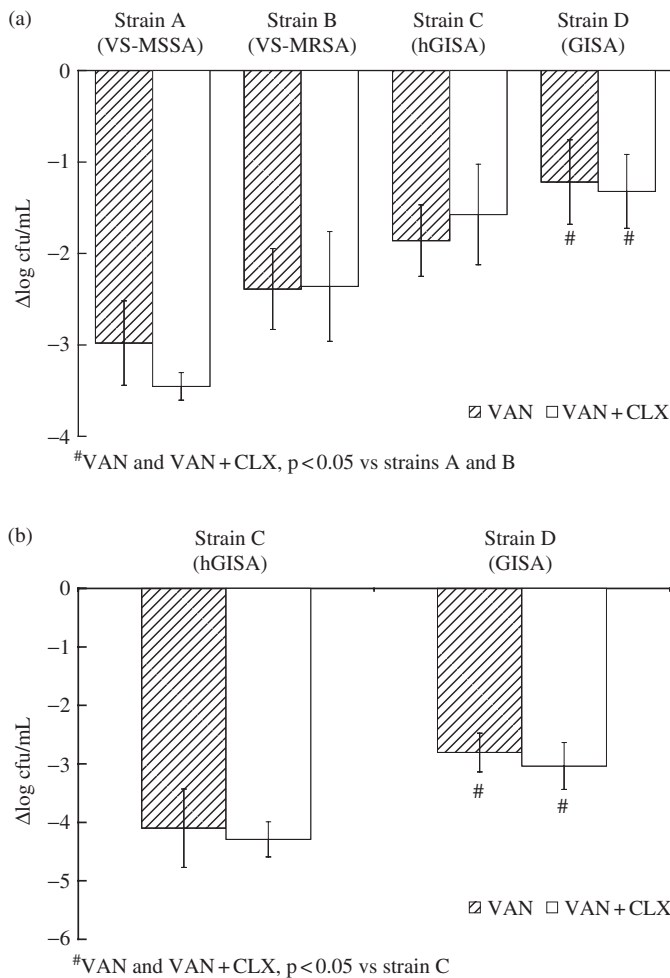
### Discussion

The *in vitro* effect of combining glycopeptides and  $\beta$ -lactams against VS-MRSA, hVISA and GISA strains is a highly controversial issue. It has been proposed that the efficacy of these

combinations depends on the glycopeptide susceptibility phenotype. If this is the case, synergistic results would be found against highly vancomycin-resistant isolates, given that the significant alterations in cell wall composition required for vancomycin resistance make these isolates more sensitive to  $\beta$ -lactam antibiotics.<sup>17,18</sup> However, not all the observations in this setting support this suggestion.<sup>13,15,16,19–24,26</sup>

In the present study, we evaluated the efficacy of these combinations against four strains of *S. aureus* with different glycopeptide susceptibilities, first *in vitro* and then *in vivo*. We used two susceptible strains A and B (VS-MSSA and VS-MRSA) and two heteroresistant and intermediate-resistant strains C and D (hGISA and GISA), which have been associated with clinical failures following glycopeptide therapy;<sup>1,6</sup> our hGISA strain (strain C), belonging to the reported Iberian clone, was equivalent to standard Mu3 strain. In time–kill curves, a synergistic effect between glycopeptides and  $\beta$ -lactams was observed for all the *S. aureus* strains studied at sub-MIC concentrations for both antibiotic groups. The relationship between this synergistic effect and the degree of vancomycin resistance was only partially observed. On the one hand, combinations showed the highest efficacy against strain D (GISA), most of them being synergistic and bactericidal, whereas with strains B (VS-MRSA) and C (hGISA) they were only bacteriostatic. However, with strain A (VS-MSSA), the combinations of glycopeptides and  $\beta$ -lactams also showed synergy and, in fact, were highly bactericidal with cefotaxime. Similarly, an *in vitro* synergistic effect between vancomycin and cefepime against some MSSA strains has been described.<sup>22</sup>

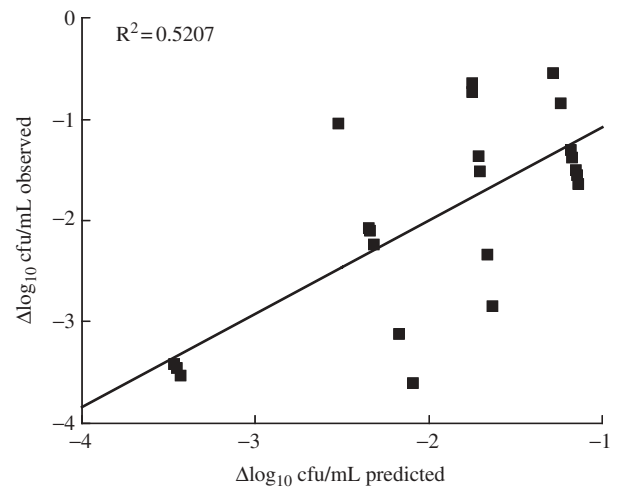
Another controversial aspect regarding the possible synergism of glycopeptide and  $\beta$ -lactam combination against VS-MRSA, hGISA and GISA strains is the influence of the concentration of  $\beta$ -lactams on the effect of such combinations.<sup>21,24,26</sup> It has been suggested that  $\beta$ -lactams at or near the MIC may produce a synergistic or additive effect, while lower  $\beta$ -lactam concentrations combined with vancomycin may be antagonistic. In our study,



**Figure 2.** (a) Comparison of vancomycin (VAN) versus vancomycin plus cloxacillin (VAN + CLO) efficacy at 24 h (strains A, B, C and D) in the therapy of peritoneal infection due to *S. aureus*. Data are expressed as decrease in bacterial count in peritoneal fluid between therapeutic groups at 24 h and control groups at 0 h ( $\Delta \log_{10}$  cfu/mL). (b) Comparison of vancomycin (VAN) versus vancomycin plus cloxacillin (VAN + CLO) efficacy at 48 h (strains C and D) in the therapy of peritoneal infection due to *S. aureus*. Data are expressed as decrease in bacterial count in peritoneal fluid between therapeutic groups at 48 h and control groups at 0 h ( $\Delta \log_{10}$  cfu/mL).

we observed synergism and/or bactericidal activity with oxacillin at concentrations considerably lower than the MIC (range 4–16 mg/L). However, our results were not in clear disagreement with those reported by other authors,<sup>13,16,26</sup> since oxacillin concentrations at which they observed synergism (referred to as ‘near the MIC’) were in the same range as ours (referred to as ‘sub-MIC’), depending on the MICs for the strains studied. We selected the test concentrations according to MICs for the strains and the range of achievable human serum levels; consequently, we did not study the effect of concentrations of  $\beta$ -lactams  $< 4$  mg/L and so we cannot rule out a possible antagonistic effect at these low levels. In any case, we conclude that sub-MIC levels of  $\beta$ -lactams do not necessarily determine antagonism against hGISA and GISA strains, as has been stated elsewhere.<sup>21,24,32</sup>

As we described previously,<sup>14</sup> our mouse peritonitis model was able to compare the efficacy among different antibiotic therapies and also the efficacy of a therapy among strains with different



**Figure 3.** Observed versus predicted values for vancomycin plus cloxacillin combination. Predicted values were based on the PDIs for both antibiotics. PDIs are calculated on the basis of the different susceptibilities of the strains involved in the study.

susceptibilities. We selected bacterial counts in PF as the major endpoint for the assessment of antibiotic efficacy, since the differences found in bacteraemia rates between the antibiotic schedules were usually in a narrow range and mortality was 0% for all therapies.<sup>14</sup> We used a short period of treatment of 24 h in order to increase the relevance of the model, since this is the critical period of such an acute infection.

In this experimental study, a direct relationship between the increase in MICs of vancomycin and the decrease in the efficacy of glycopeptide and  $\beta$ -lactam combinations was observed; in a similar way, we have previously reported that the increase in glycopeptide resistance was correlated to a decrease in the efficacy of monotherapies with vancomycin or teicoplanin,<sup>14</sup> and also it is in agreement with clinical data on the relevant influence of glycopeptide susceptibility.<sup>1,9</sup> The synergistic pattern clearly found in *in vitro* tests was not observed, since combinations of glycopeptides and  $\beta$ -lactams did not significantly improve the efficacy of monotherapies with glycopeptides against any strain, although antagonism was not detected either. A confirmation of this point was given, first, by the multiple regression analysis of the efficacy of the combination, which showed that only AUC/MIC of vancomycin could explain the efficacy of the combination and  $t > \text{MIC}$  for cloxacillin was not significant to the model; second, in Figure 3, in which the predicted and the observed efficacy of the combination were similar or, in other words, the intercept of the regression line between predicted and observed responses was  $\sim 0$ , indicating that the combinations have no synergy (as it was previously proposed by Mouton *et al.*<sup>31</sup>). Prolonging the treatment up to 48 h did not provide significant additional information about differences in monotherapy and combination activities, although both increased slightly at this time point. Antibiotic doses were selected on the basis of achievable concentrations in humans in clinical practice (according to susceptible strains). At these doses, it seems logical that sub-inhibitory concentrations were found in animal experiments involving resistant strains (B, C and D for  $\beta$ -lactams, and C and D for glycopeptides); following the same criteria we selected concentrations for *in vitro* studies which were also in the sub-inhibitory range. The discrepancies observed

between *in vitro* and *in vivo* experiments using these sub-inhibitory concentrations are difficult to explain, even accepting the differences between both environments.

Why our model was not able to corroborate the *in vivo* synergism observed by Climo *et al.*<sup>13</sup> using glycopeptides and  $\beta$ -lactams in a model of endocarditis by GISA could be explained by differences in the experimental design of both studies. Endocarditis is a deep-seated and more difficult-to-treat infection and penetration of vancomycin or teicoplanin in cardiac vegetations is lower than in the peritoneum. In addition, models were based on different animal species and involved distinct treatment schedules. While vancomycin monotherapy failed in endocarditis, it preserves a certain activity in the mouse peritonitis model against the same GISA strain (Mu50); the addition of a  $\beta$ -lactam resulted in a synergistic combination in the first model and was indifferent in the second one. Whereas the endocarditis model was shown to be adequate to assess the effect of the combinations, it may be that our peritonitis model was not demanding enough, although the observation that slight increases in vancomycin MICs determined a progressive loss of the efficacy of the combined therapy is a differential finding of our model.

In conclusion, while substantial synergism was observed in *in vitro* time-kill studies with combinations of  $\beta$ -lactams and glycopeptides against VS-MSSA, VS-MRSA, hGISA and especially against the GISA (Mu50) strain, in the mouse peritonitis model only occasional traces of this activity were found. On the other hand, no antagonism was observed either *in vitro* or *in vivo* at any sub-MIC  $\beta$ -lactam concentration. However, the most important issue continues to be the actual potential of these combinations in clinical practice. There is a certain microbiological and experimental basis for a synergistic effect, and combinations may be useful in highly specific clinical conditions, but overall it does not seem that this alternative will play a major role in the therapy of most hGISA and GISA infections in the coming years.

## Acknowledgements

We thank Drs J. M. Ramón and C. Masuet, from Hospital Universitari de Bellvitge, for their assistance in the statistical analysis. This work was supported by a research grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias FIS 00/0156 from the Ministerio de Sanidad, Spain. A. D. was supported by a grant from the Universitat de Barcelona, and S. R. and A. M. by grants from the Fundació August Pi i Sunyer. All authors are members of the Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI). The study was performed without any financial support from pharmaceutical companies. This study was presented in part at the Forty-third Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) of the American Society for Microbiology, held in Chicago in September 2003 (Abstract 1987).

## References

1. Ariza J, Pujol M, Cabo J *et al.* Vancomycin in surgical infections due to methicillin-resistant *S. aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin. *Lancet* 1999; **353**: 1587–8.
2. Centers for Disease Control and Prevention. Update: *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin—United States, 1997. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1997; **46**: 813–5.

3. Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin—Illinois, 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2000; **48**: 1165–7.
4. Geisel R, Schmitz FJ, Thomas L *et al.* Emergence of heterogeneous intermediate vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates in the Dusseldorf area. *J Antimicrob Chemother* 1999; **43**: 846–8.
5. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H *et al.* Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 1997; **350**: 1670–3.
6. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T *et al.* Methicillin-resistant *S. aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 1997; **40**: 135–46.
7. Kim MN, Pai CH, Woo JH *et al.* Vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* in Korea. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 3879–81.
8. McManus J. Vancomycin resistant staphylococcus reported in Hong Kong. *BMJ* 1999; **318**: 626.
9. Moore MR, Perdreau-Remington F, Chambers HF. Vancomycin treatment failure associated with heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a patient with endocarditis and in the rabbit model of endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 1262–6.
10. Ploy MC, Grelaud C, Martin C *et al.* First clinical isolate of vancomycin-intermediate *S. aureus* in a French hospital. *Lancet* 1998; **351**: 1212.
11. Rotun SS, McMath V, Schoonmaker DJ *et al.* *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin isolated from a patient with fatal bacteraemia. *Emerg Infect Dis* 1999; **5**: 147–9.
12. Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR *et al.* Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 1999; **340**: 493–501.
13. Climo WM, Paton RL, Archer GL. Combinations of vancomycin and  $\beta$ -lactams are synergistic against staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**: 1747–53.
14. Domenech A, Ribes S, Cabellos C *et al.* A mouse peritonitis model for the study of glycopeptide efficacy in GISA infections. *Microb Drug Resist* 2004; **10**: 346–53.
15. Barr JG, Smyth ET, Hogg GM. *In vitro* antimicrobial activity of imipenem in combination with vancomycin or teicoplanin against *S. aureus* and *S. epidermidis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; **9**: 804–9.
16. Sieradzki K, Roberts RB, Haber SW *et al.* The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *N Engl J Med* 1999; **340**: 517–23.
17. Sieradzki K, Tomasz A. Suppression of  $\beta$ -lactam antibiotic resistance in a methicillin-resistant *S. aureus* through synergic action of early cell wall inhibitors and some other antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1997; **39** Suppl A: 47–51.
18. Sieradzki K, Tomasz A. Inhibition of cell wall turnover and autolysis by vancomycin in a highly vancomycin-resistant mutant of *S. aureus*. *J Bacteriol* 1997; **179**: 2557–66.
19. Domaracki BE, Evans AM, Venezia RA. Vancomycin and oxacillin synergy for methicillin-resistant staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 1394–6.
20. Hanaki H, Hiramatsu K. Combination effect of teicoplanin and various antibiotics against hetero-VRSA and VRSA. *Kansenshogaku Zasshi [Japanese]* 1999; **73**: 1048–53.
21. Howe RA, Wootton M, Bennett PM *et al.* Interactions between methicillin and vancomycin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains displaying different phenotypes of vancomycin susceptibility. *J Clin Microbiol* 1999; **37**: 3068–71.
22. Lozniewski A, Lion C, Mory F *et al.* *In vitro* synergy between cefepime and vancomycin against methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother* 2001; **47**: 83–6.
23. Seibert G, Isert D, Klesel N *et al.* The *in-vitro* antibacterial activity of a combination of ceftiofame or cefoperazone with vancomycin against enterococci and *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1992; **29** Suppl A: 25–30.

24. Aritaka N, Hanaki H, Cui L *et al.* Combination effect of vancomycin and  $\beta$ -lactams against *S.aureus* strain, Mu3, with heterogeneous resistance to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 1292–4.
25. Goldstein FW, Atoui R, Ben Ali A *et al.* False synergy between vancomycin and beta-lactams against glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* (GISA) caused by inappropriate testing methods. *Clin Microbiol Infect* 2004; **10**: 342–5.
26. Haraga I, Nomura S, Nagayama A. The effects of vancomycin and  $\beta$ -lactam antibiotics on vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 1999; **341**: 1624.
27. National Committee for Clinical and Laboratory Standards. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically—Fifth Edition: Approved Standard M7-A5*. NCCLS, Villanova, PA, USA, 2000.
28. National Committee for Clinical and Laboratory Standards. *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents—Tentative Guideline: NCCLS Document M26-T*. NCCLS, Villanova, PA, USA, 1992.
29. Frimodt-Moller N. The mouse peritonitis model: present and future use. *J Antimicrob Chemother* 1993; **31** Suppl D: 55–60.
30. Knudsen JD, Frimodt-Moller N, Espersen F. Experimental *Streptococcus pneumoniae* infection in mice for studying correlation of *in vitro* and *in vivo* activities of penicillin against pneumococci with various susceptibilities to penicillin. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**: 1253–8.
31. Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis* 2001; **1**: 147–55.
32. Mouton JW, van Ogtrop ML, Andes D *et al.* Use of pharmacodynamic indices to predict efficacy of combination therapy *in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**: 2473–8.

## **DISCUSIÓN**





## 5. DISCUSIÓN

### Modelo de peritonitis por *S. aureus* en el ratón

El modelo de peritonitis en ratón ha sido ampliamente utilizado en el pasado en la investigación antiinfecciosa, bien en estudios de patogénesis, bien en el estudio de la terapéutica antimicrobiana. Como se ha comentado anteriormente, con la mortalidad como variable principal, este modelo es útil pero limitado: se puede valorar la eficacia de un antibiótico pero la comparación de varios tratamientos o cepas resultaría mucho más costoso en términos estadísticos (tamaño muestral), económicos y de tiempo. Nos planteamos, pues, desarrollar una versión optimizada de este modelo que fuera más eficiente y rentable. El principal objetivo fue desarrollar un modelo lo suficientemente afinado, capaz de detectar diferencias sutiles entre dos o más pautas terapéuticas (a priori con actividad similar) o entre cepas con diferencias pequeñas en su sensibilidad frente a los antibióticos implicados.

La primera variable analizada fue la cepa de ratón. Basándonos en las medias del recuento bacteriano en líquido peritoneal (LP), la dispersión de éste y la tasa de bacteriemia en el tiempo, se escogió finalmente la cepa consanguínea C57BL/6. La homogeneidad genética de esta cepa se tradujo en una mayor susceptibilidad a la infección y en unos datos más homogéneos en términos generales. Otra variable importante implicada en el diseño es el tamaño del inóculo. En nuestro caso buscamos un inóculo que produjera recuentos bacterianos altos en el peritoneo y alta tasa de bacteriemia, pero con una mortalidad baja en las primeras horas de la infección, para que el grueso de los animales llegara con garantías al inicio del tratamiento y pudiéramos utilizar animales control (sin tratamiento) en los experimentos terapéuticos. Así, encontramos recuentos bacterianos en LP entre 7-8 log UFC/ml y bacteriemia del 100% para inóculos de  $10^6$  y  $10^7$  ufc/ml, mientras la mortalidad varió entre el 0% y el 80% a las ocho horas de la inoculación para los mismos inóculos, lo que da una idea de la importancia de este parámetro. Dependiendo también de la cepa, la mortalidad para un inóculo de  $10^6$  ufc/ml se situó entre el 21% y 62% a las 24 horas de

la inoculación, lo que refleja la virulencia del modelo. El tamaño final del inóculo se ajustó teniendo en cuenta este último dato, oscilando entre  $5-9 \times 10^6$  ufc/ml para la cepa MSSA y  $1-5 \times 10^7$  para el resto.

Las principales ventajas del modelo de peritonitis en ratón fueron su reproducibilidad, su sencillez de manejo y su bajo coste, muy por debajo de otros modelos animales. La homogeneidad de datos y la sensibilidad de parámetros como el recuento de UFC confirman su utilidad para este tipo de estudios.

### **Glucopéptidos y $\beta$ -lactámicos como monoterapia de la peritonitis experimental por *S. aureus* con diferentes patrones de sensibilidad**

Vancomicina a las dosis de 30 mg/kg escogidas alcanzó un pico sérico en el rango del de los humanos, con un cociente  $C_{max}/CMI$  (IQ) óptimo para las cepas MSSA y MRSA (cepas A y B, ambas VS), correcto para la cepa hGISA (C) y ligeramente por debajo de lo recomendado para la cepa GISA (D). Se administró cada 4 horas (dosis total 180 mg/kg/d) para mantener el  $T > CMI$  lo más alto posible ( $>70\%$  para las cepas A y B;  $\sim 50\%$  para C y D). La administración de teicoplanina a 40 mg/kg/d en monodosis permitió alcanzar altos niveles séricos y una concentración valle (24 h) cercana a la recomendada; debido a su larga vida media mostró una  $AUC_{0-24h}$  muy elevada y los  $T > CMI$  oscilaron entre el 100% para las cepas A y B, y algo más del 50% para las C y D. En general, los índices IQ y  $t > CMI$  confirmaron un buen perfil PK/PD para teicoplanina, similar al que presenta en humanos. El parámetro  $AUC_{0-24h} / CMI$  fue óptimo para ambos antibióticos frente a las cepas A y B, y disminuyó por debajo del valor recomendado de 125 frente a las cepas C y D; como se observó posteriormente, esto se correlacionó con una pérdida significativa de eficacia de ambos antibióticos frente a estas dos cepas.

La eficacia de vancomicina decreció progresivamente de la cepa A a la C, mostrando una buena correlación con el (también progresivo) aumento de las CMIs y la consecuente disminución de los valores de los parámetros PK/PD (tabla 2, pág. 350, MDR 10:346-353). Teicoplanina mostró buena eficacia frente a la infección por las cepas A y B, pero sólo moderada frente a las cepas C y D, acorde, también, a su perfil PK/PD.

En los experimentos frente a las cepas A y B, con CMI's más bajas frente a los dos glucopéptidos, vancomicina mostró una actividad ligeramente mejor que teicoplanina. Este efecto se hizo más evidente frente a las cepas C y D (en las que disminuye la sensibilidad a ambos antibióticos) aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos glucopéptidos. Así, a pesar de su aparente mejor perfil PK/PD, teicoplanina fue menos eficaz *in vivo* que vancomicina, confirmando un patrón que tiene precedentes en la literatura científica (62, 142, 145). Es interesante como estas diferencias son más palpables frente a las cepas hGISA y GISA, lo que sugiere que teicoplanina perdería eficacia un paso antes que vancomicina y podría actuar como un marcador en este sentido (146). Un artículo reciente publicado por Pavie y col. describe el impacto del fenotipo GISA sobre la terapia con teicoplanina en un modelo de endocarditis experimental, observación que se alinea con nuestros resultados (146). La baja penetración en algunos tejidos y el alto nivel de unión a proteínas plasmáticas se han propuesto como algunas de las causas para el fracaso de teicoplanina en algunas infecciones clínicas i/o experimentales (57, 65, 137, 146, 147), aunque *in vitro* también observamos una menor actividad intrínseca de teicoplanina en comparación con vancomicina (ver resultados).

Frente a la cepa A (VS-MSSA), cloxacilina y cefotaxima fueron más eficaces que los glucopéptidos, llegando a ser bactericidas a las 24h, confirmando la predicción a partir de sus índices farmacodinámicos (PDIs), en este caso el  $T > CMI$ . Vancomicina y teicoplanina no llegaron a ser bactericidas, poniéndose de manifiesto la conocida superioridad de los  $\beta$ -lactámicos frente a los glucopéptidos en infecciones por cepas MSSA (72, 74, 148). Ambos  $\beta$ -lactámicos retuvieron una mínima actividad frente a la cepa B a pesar de unos PDIs claramente desfavorables ( $T > CMI \sim 0$ ); sorprendentemente, cloxacilina tuvo una actividad moderada frente a las cepas C y D, dato que no parece consistente con su perfil PK/PD respecto a estas cepas. Un argumento que explicaría parcialmente este hecho es el descrito por Sieradzki y Tomasz, que destacaron la pérdida recíproca de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos en las cepas que perdían la sensibilidad a vancomicina (123, 124). Por un lado observaron cómo cepas mutantes de laboratorio de *S. aureus* resistentes a vancomicina reducían su resistencia a  $\beta$ -lactámicos según aumentaban sus CMI's a glucopéptidos; por otro

apuntaron que la adquisición de esta resistencia a glucopeptidos implicaba el paso de un fenotipo de resistencia homogéneo a meticilina a uno heterogéneo. En nuestro caso, aun cuando las cepas hGISA y GISA (C y D) utilizadas en nuestros experimentos continúan siendo altamente resistentes a meticilina si atendemos a sus CMI, plantearíamos la hipótesis de que la creciente eficacia *in vivo* de cloxacilina en estas cepas se deba a la emergencia de subpoblaciones más sensibles, lo que reflejaría una etapa temprana en el tránsito hacia un fenotipo de resistencia heterogéneo.

### **Eficacia de vancomicina y teicoplanina en el tratamiento de la infección por GISA.**

La eficacia de vancomicina y teicoplanina en el tratamiento de la peritonitis por las cepas B, C y D decreció progresivamente en paralelo al aumento de sus CMI a glucopeptidos. Es interesante observar cómo los porcentajes de bacteriemia aumentaron también progresivamente (de la cepa B a la D) de manera análoga al descenso del *killing* de los glucopeptidos; esto es, existió concordancia entre bacteriemia y recuentos en LP. La comparación de la eficacia de los glucopeptidos entre las cuatro cepas revela la existencia de una relación lineal inversa entre las CMI para vancomicina y su eficacia *in vivo*. Este resultado sugiere que el descenso en la sensibilidad de *S. aureus* a los glucopeptidos podría tener implicaciones clínicas; en este sentido, algunos autores ya han descrito la influencia del fenotipo GISA y hGISA en la clínica (84-86, 109, 110), con fracasos terapéuticos en el contexto de infecciones graves como endocarditis, bacteriemia, infecciones osteoarticulares y de prótesis o abscesos no drenados.

Otra lectura que se desprende de nuestros experimentos es el remanente de actividad que todavía parece mantener vancomicina frente a las cepas C y D. Aunque escasa, esta actividad bacteriostática residual podría tener cierta importancia. Así, es probable que en numerosos casos no complicados e infecciones más leves como, por ejemplo, infecciones de piel y tejidos blandos no necrotizantes, la disminución en la sensibilidad a vancomicina no alcance relevancia clínica y ésta funcione de forma equivalente a como lo hace en infecciones por VS-MRSA. Sería específicamente en los casos de infecciones graves y/o que presentan importantes factores concomitantes

decisivos para que la infección sea difícil de curar, en los que la presencia de una cepa hGISA implicaría el fracaso terapéutico del tratamiento con vancomicina en comparación con una infección debida a una cepa VS-MRSA.

El modelo de peritonitis se mostró especialmente útil para comparar la eficacia de diferentes antibióticos en el tratamiento de la infección por *S. aureus*; también permitió observar la influencia que tienen sobre la eficacia de un tratamiento variaciones mínimas en la sensibilidad de diferentes cepas. Nuestro estudio sugiere que la resistencia heterogénea a glucopéptidos y el aumento de las CMI que implica puede asociarse con una pérdida de eficacia de estos antibióticos.

#### **Actividad *in vitro* de la combinación de glucopéptidos y $\beta$ -lactámicos frente a *S. aureus* con diferente patrón de sensibilidad: VS-MSSA, VS-MRSA, hGISA y GISA**

El efecto *in vitro* de la combinación de glucopéptidos y  $\beta$ -lactámicos frente a cepas de *S. aureus* con diferente sensibilidad a glucopéptidos es un tema controvertido. Se ha propuesto que la eficacia de estas combinaciones dependería de la sensibilidad de *S. aureus* a los glucopéptidos (122). Basándose en las alteraciones en la pared celular requeridas en el desarrollo de la resistencia a vancomicina, que implican también una recuperación de la sensibilidad a los  $\beta$ -lactámicos por parte de estas cepas, se ha planteado la hipótesis de que el efecto sinérgico de las combinación glucopéptido-  $\beta$ -lactámico debería ser mayor cuanto mayor fuera la resistencia a glucopéptidos (122, 123). Esto es, que la combinación sería claramente activa frente a GISA y quizá no frente VS-MRSA. Sin embargo, no todos los datos sustentan esta propuesta (116-121).

Hemos evaluado la eficacia de estas combinaciones *in vitro* e *in vivo* frente a las cuatro cepas incluidas en el estudio, dos de ellas sensibles a glucopéptidos (VS-MSSA y VS-MRSA), otra con heterorresistencia (hGISA) y la cuarta con resistencia intermedia (GISA), las dos últimas, además, relacionadas con fracasos clínicos (76, 84). Los resultados *in vitro* mostraron el efecto sinérgico de las combinaciones entre glucopéptidos y  $\beta$ -lactámicos frente a todas las cepas de *S. aureus*, a concentraciones por debajo de la CMI (como se ha comentado anteriormente, las concentraciones relevantes), aunque no en todos los casos con la misma intensidad. Las combinaciones

resultaron más activas frente a la cepa VS-MSSA (la más sensible) y GISA (la resistente), alcanzando frente a éstas un efecto bactericida; mientras, su actividad frente a las cepas intermedias fue más discreta, mostrando sólo un efecto bacteriostático y sin diferencias apreciables entre las dos. Así, la hipotética relación entre el efecto sinérgico de las combinaciones y el grado de resistencia a glucopéptidos, propuesta a partir de los trabajos de Sieradzki y Tomasz (122-124), fue sólo parcialmente observada (sí para GISA, no para hGISA respecto a MRSA). Existen, sin embargo, precedentes en la literatura que han descrito el efecto sinérgico de estas combinaciones frente a cepas *S. aureus* con diferentes grados de resistencia a glucopéptidos y  $\beta$ -lactámicos (incluyendo cepas MSSA, MRSA y hGISA), sin que el grado de resistencia a vancomicina parezca tener una relación directa (116-121). En nuestro caso, tampoco podemos confirmar este punto.

Otro aspecto controvertido en relación a la posible sinergia de las combinaciones glucopéptidos- $\beta$ -lactámicos frente a cepas MRSA, GISA o hGISA es la influencia de la concentración del  $\beta$ -lactámico en el efecto final de éstas (118, 125, 127). Se ha sugerido que para que se produzca un efecto sinérgico, la concentración del  $\beta$ -lactámico debería ser igual o superior a la CMI respecto a la cepa sobre la que actúa, mientras que a concentraciones inferiores a la CMI, el efecto podría ser antagónico. En nuestro estudio no observamos esta circunstancia y el efecto sinérgico se mantuvo a concentraciones considerablemente por debajo de la CMI. De hecho, es prácticamente imposible que la concentración sérica de los  $\beta$ -lactámicos pueda estar cerca de la CMI si hablamos de cepas MRSA (con o sin resistencia a glucopéptidos) con CMIs de 1024  $\mu\text{g/ml}$  o superiores; en ningún caso los niveles séricos que se dan en humanos se acercarían a esos valores. Sin embargo, si se analizan cuidadosamente los resultados de los trabajos que describen este antagonismo y se comparan con los de nuestro estudio, las diferencias podrían ser poco importantes. Así, las concentraciones a las que Aritaka y col. (125) observaron sinergia fueron similares a las nuestras, al margen de su relación con la CMI. La diferencia estaría más en la sensibilidad de las cepas estudiadas, lo que determinaría en nuestro estudio que los niveles de sinergia estuvieran por debajo de la CMI, y en el de otros autores no fuera así. En consecuencia, nuestra hipótesis iría en el sentido de que la relación del  $\beta$ -lactámico con la CMI no

determinaría el efecto final de la combinación, y que lo más importante sería la concentración absoluta del  $\beta$ -lactámico. En nuestro caso, además, la selección de las concentraciones para el estudio *in vitro* (curvas de letalidad) se hizo con criterios farmacocinéticos, esto es, se evaluaron las concentraciones alcanzables en suero humano en relación a las dosis clínicas, por lo que algunas de las concentraciones sub-inhedorias valoradas *in vitro* por otros autores (p. ej.  $< 4 \mu\text{g/ml}$ ) no se estudiaron. En ese rango no podemos descartar un efecto antagónico, aunque consideramos que tampoco sería de gran interés clínico. De cualquier forma, nuestra conclusión en este punto pretende hacer énfasis en que las concentraciones sub-inhedorias de  $\beta$ -lactámicos en combinación con glucopéptidos frente a cepas hGISA y GISA no son necesariamente antagónicas.

#### **Eficacia *in vivo* de la combinación de glucopéptidos y $\beta$ -lactámicos en el modelo de peritonitis en el ratón**

El estudio *in vivo* de las combinaciones entre glucopéptidos y  $\beta$ -lactámicos en el modelo de peritonitis en el ratón no confirmó el patrón de sinergia observado *in vitro*. Las combinaciones no mejoraron de manera significativa la eficacia de las monoterapias frente a ninguna de las cuatro cepas; tampoco se detectó antagonismo. Análogamente a lo sucedido con los glucopéptidos en monoterapia, se observó una relación directa entre el aumento en la CMI de los glucopéptidos y la disminución de la eficacia (fig. 2.a, art. JAC 56:709-16). En algún caso apreciamos una cierta tendencia a la mejora de la eficacia con las combinaciones entre teicoplanina y  $\beta$ -lactámicos respecto a teicoplanina en solitario (con peor actividad que vancomicina como monoterapia), aunque ésta no tuvo una confirmación estadística ni tampoco resultó un patrón generalizado.

El análisis estadístico basado en los PDIs confirmó la equivalencia entre la monoterapia con vancomicina y la combinación de ésta con cloxacilina (principales antibióticos utilizados en la clínica). En primer lugar, el análisis de regresión múltiple de la eficacia de la combinación como función de los parámetros farmacodinámicos asociados a vancomicina y cloxacilina (los que mejor predicen la eficacia cada uno por

separado) mostró cómo sólo AUC/CMI de vancomicina podría explicar la eficacia de la combinación (es significativo para el modelo de regresión), mientras que  $t > \text{CMI}$ , asociado a cloxacilina, no fue significativo para el modelo. La interpretación se basó en que si ambos parámetros hubieran sido significativos dentro de la regresión, esto se podría relacionar con un efecto sinérgico o aditivo; en cambio, si se correlacionaba solo uno, el segundo antibiótico no tenía ningún peso en la actividad de la combinación, esto es, el efecto de la combinación era indiferente. El segundo apunte estadístico, basado en un análisis propuesto por Mouton y col. (144), comparó la eficacia de la combinación observada experimentalmente con una predicción (calculada según se describe en el apartado del diseño experimental). En nuestro caso, la predicción fue similar a la observación ( $X \sim Y$ ), con lo que la recta de regresión predicción-observación que se infiere corta el eje de coordenadas ( $X$  e  $Y \sim 0$ ), lo que se interpreta como no adición ni sinergia (fig. 2.b, art. JAC 56:709-16); si la recta cortara en otro punto que no fuera el eje de coordenadas, por ejemplo en un valor  $\Delta\text{UFC}$  negativo (eje  $Y$ ), indicaría que la combinación tenía algún efecto sinérgico. Este análisis estadístico final permitió afianzar la validez de nuestros resultados, que mostraron una falta de relación en los experimentos *in vitro* e *in vivo*. En este sentido, la realización de experimentos adicionales prolongando el tratamiento hasta las 48h, planteados para asegurar el patrón de eficacia observada a las 24h, no nos aportó nueva información significativa (fig. 2.b, art. JAC 56:709-16). La eficacia de las monoterapias y las combinaciones se mantuvo y el descenso en el recuento de UFC se afianzó globalmente, pero no se observaron diferencias entre combinaciones y monoterapias.

Como se ha explicado ya anteriormente, las dosis de antibiótico utilizadas en el modelo fueron seleccionadas en base a criterios farmacodinámicos, teniendo en cuenta la farmacocinética en humanos y los parámetros PK/PD recomendados. Así, de la misma forma en que sucedía *in vitro*, en el modelo de peritonitis con las cepas B, C, y D las concentraciones séricas de los  $\beta$ -lactámicos estuvieron por debajo de la CMI durante todo el intervalo de dosificación, y, en el caso de los glucopéptidos, de manera significativa en la infección por las cepas C y D. Las discrepancias entre los resultados *in vitro* e *in vivo* no parece, pues, que puedan justificarse por una diferencia en el binomio concentraciones-sensibilidad. Si asumimos esta “cierta equivalencia” en



---

cuanto a concentraciones se refiere, la diferente respuesta *in vitro* (sinergia) e *in vivo* (equivalencia) no tiene una explicación clara.

En este sentido, nuestro estudio no ha confirmado los resultados publicados por Climo y col. en el modelo de endocarditis en el conejo (121), en el que la combinación de vancomicina con nafcilina fue eficaz frente a la cepa GISA Mu50 (la misma que en nuestro estudio) mientras el tratamiento con vancomicina como monoterapia fracasó. El diseño experimental de los dos estudios y los modelos animales presentan muchas diferencias, lo que podría explicar parte de las discrepancias en los resultados. Por un lado, la endocarditis es una infección con mayor morbilidad, de difícil tratamiento; por otro, la penetración de los glucopéptidos en las vegetaciones cardíacas es menor que en el peritoneo. Estos dos factores justificarían una menor eficacia de la monoterapia con vancomicina en el tratamiento de la endocarditis. Por otro lado, los modelos están basados en especies distintas y las dosis, vías de administración e intervalos de dosificación son también diferentes. Así, mientras en el modelo de endocarditis fracasó la monoterapia con vancomicina, ésta mantiene cierta actividad en nuestro modelo de peritonitis frente a la misma cepa GISA (Mu50); por otro lado, la adición de un  $\beta$ -lactámico resultó en una combinación eficaz en el primer modelo y fue equivalente a vancomicina en solitario en el segundo. A priori podríamos pensar que el modelo de peritonitis no fue suficientemente exigente respecto a la eficacia de la monoterapia con glucopéptidos (quizá sí con teicoplanina, inferior a vancomicina en todos los casos, y con escasa eficacia frente a las cepas hGISA y GISA), puesto que éstos no fracasaron explícitamente mientras sí ocurrió así en el modelo de endocarditis. Desde ese punto de partida (el fracaso de vancomicina), el modelo de endocarditis parecería más adecuado para poder valorar la eficacia de la combinación. Sin embargo, nuestro modelo se ha mostrado sensible a la hora de detectar la pérdida de eficacia debido a leves incrementos en la CMI (tanto de las monoterapias como de las combinaciones), lo que lo acredita como un modelo solvente. ¿Por qué no sería capaz de reflejar un posible efecto sinérgico? El argumento de que el fracaso de la monoterapia (como ocurre en el modelo de endocarditis) podría poner de manifiesto el efecto sinérgico de la combinación fue descartado tras un ensayo en el que se administró vancomicina a la mitad de dosis. El tratamiento con el glucopéptido fracasó, pero también lo hizo la

combinación. A pesar de que algunos de los factores comentados (diferentes modelos, diferente infección, diferentes perfiles PK/PD, diferente diseño) pueden tener su influencia, ninguno parece darnos un argumento único y sólido del porqué de las discrepancias entre los resultados de ambos estudios, más aún si tenemos en cuenta la solvencia que el modelo ha mostrado en la comparación entre diferentes tratamientos y frente a diferentes cepas.

Asumiendo la cautela con la que hay que interpretar los estudios experimentales y a pesar de alguna observación de cierta tendencia a la mejora de la eficacia, nuestro estudio nos llevaría a la conclusión final de que las combinaciones entre glucopéptidos y  $\beta$ -lactámicos no serían una alternativa con garantías para el tratamiento de las infecciones por GISA. Su utilidad podría no descartarse en situaciones muy particulares, como en determinadas infecciones (que deberían investigarse en profundidad), pero no parece que su uso pueda generalizarse.

### **Consideraciones finales**

La extrapolación de los resultados experimentales al ámbito de la terapia clínica es siempre delicada. Así, la contribución real de la sensibilidad disminuida a vancomicina en el fracaso terapéutico no es fácil de valorar, en parte debido a la cirugía concomitante que necesitan muchas de estas infecciones para su curación, que implica la retirada de prótesis o el drenaje de abscesos. Sin embargo, es precisamente en este tipo de infecciones en las que el aislamiento de hGISA podría tener mayor relevancia clínica. Varios trabajos así lo atestiguan. En un estudio realizado en nuestro hospital se observó una tasa de más del 80% de fracasos terapéuticos en un grupo de 14 pacientes con infección ortopédica por hGISA, la mayoría de ellos con prótesis (84). Aunque las prótesis tienen indudablemente influencia en el resultado, la elevada tasa de fracasos observada sugiere que las cepas hGISA jugaron también un papel, condicionando la evolución de la infección. En otros estudios comparativos se ha analizado la evolución de pacientes con infecciones por GISA, hGISA y VS-MRSA. A pesar del tamaño de las muestras y del diseño retrospectivo, estos estudios aportan datos sugerentes sobre la relevancia clínica de la disminución de la sensibilidad a vancomicina. Fridkin y col.

(86) observaron que la mortalidad intrahospitalaria fue del 63% para un grupo de pacientes con infecciones por GISA/hGISA respecto al 12% del grupo control VS-MRSA, mostrando la infección por hGISA como una enfermedad muy parecida a la producida por GISA. Por otro lado, Charles y col. (109) compararon la evolución durante 12 meses de 5 pacientes con bacteriemia por hGISA (CMI<sub>s</sub> 2-4 µg/ml). Los 5 casos se relacionaron con infecciones con alta carga bacteriana, como infección de prótesis, endocarditis o abscesos. Se observó una mayor tasa de fracaso terapéutico, así como fiebre más prolongada y un mayor número de hemocultivos positivos entre los pacientes con infecciones por hGISA.

Con todo esto, creemos que los criterios actuales para las definiciones de susceptibilidad y resistencia de *S. aureus* a vancomicina (extensible a teicoplanina, y por tanto a los glucopéptidos en general) podrían reconsiderarse, como ocurre, por ejemplo, con las infecciones neumocócicas y la resistencia a penicilina. En nuestra opinión, el actual punto de corte de 8 µg/ml para cepas con resistencia intermedia y de 32 µg/ml para cepas resistentes a vancomicina no se correlaciona adecuadamente con los problemas clínicos que implican estas infecciones. Así, de manera análoga a los criterios seguidos por otras sociedades científicas internacionales, es probable que 4 µg/ml para cepas con resistencia intermedia y 8 µg/ml para cepas resistentes fuera una definición más coherente desde un punto de vista clínico.



## **CONCLUSIONES**



## 6. CONCLUSIONES

1. El modelo de peritonitis por *S. aureus* en el ratón es un modelo reproducible y sencillo; el recuento de UFC en el LP es un buen indicador de la eficacia de un tratamiento, capaz de detectar pérdidas de eficacia derivadas de cambios muy leves en la sensibilidad de las diferentes cepas de *S. aureus* a los gluco péptidos.
2. En el modelo de peritonitis en el ratón, existe una correlación entre la disminución de la sensibilidad de *S. aureus* a los gluco péptidos y la pérdida de eficacia en el tratamiento de dicha infección.
3. Existe una pérdida significativa de eficacia en el tratamiento con gluco péptidos de la peritonitis experimental por *S. aureus* producida por cepas hGISA y GISA respecto a la infección producida por cepas MRSA sensibles a vancomicina.
4. La combinación de gluco péptidos y  $\beta$ -lactámicos es sinérgica *in vitro* frente a las cuatro cepas de *S. aureus* estudiadas. En el caso de las cepas MSSA y GISA, es además bactericida.
5. En el tratamiento de la peritonitis experimental por GISA, la combinación de vancomicina +  $\beta$ -lactámico no mejora significativamente la eficacia del gluco péptido en solitario.
6. Aunque existe cierta base microbiológica que describe el efecto sinérgico *in vitro* de las combinaciones entre gluco péptidos y  $\beta$ -lactámicos, los estudios *in vivo* no confirman un papel decisivo de éstas en el tratamiento de las infecciones por GISA en la clínica.





## **BIBLIOGRAFÍA**



---

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Waldvogel F. A. 2000. *Staphylococcus aureus* (including toxic shock syndrome), p. 2513-2539. In G. L. Mandell, J. E. Bennett, and R. Dolin (ed.), Principles and Practice of Infectious Diseases, 5th edition. Churchill Livingstone, New York, USA.
2. Novick R. P. 1996. Staphylococci, p. 519-530. In B. D. Davis, R. Dulbecco, H. N. Eisen and H. S. Ginsberg (ed.), Microbiology, 4<sup>th</sup> edition. J. B. Lippincot Company, Phyladelphia, USA.
3. Chang F. and J. Turnidge. 1999. *Staphylococcus aureus*, p. 389-404. In V. L. Yu, T. C. Merigan and S. L. Barriere (ed.), Antimicrobial Therapy and Vaccines. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
4. Cluff L. E., Reynolds R. J. 1965. Management of staphylococcal infections .Am. J. Med. 39:812-25.
5. Archer G. L. 1998. Staphylococcus aureus: a well-armed pathogen. Clin. Infect. Dis. 26:1179-81.
6. Lowy F. D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med. 339(8):520-32.
7. Kaplan M. H., Tenenbaum M. J. 1982. Staphylococcus aureus: cellular biology and clinical application. Am J Med. 72:248-58.
8. Projan S. J., Novick R. P. 1997. The molecular basis of pathogenicity, p. 58–82. In Crossley K. B., Archer G. L. (eds.), The staphylococci in human disease. Churchill Livingstone, New York, USA.
9. Lowy F. D., Fant J., Higgins L. L., Ogawa S. K., Hatcher V. B. 1988. *Staphylococcus aureus* –human endothelial cell interactions. J. Ultrastruct. Mol Struct. Res. 98:137-46.
10. Tompkins D. C., Hatcher V. B., Patel D., Orr G. A., Higgins L. L., Lowy F. D. 1990. A human endothelial cell membrane protein that binds *Staphylococcus aureus* in vitro. J. Clin Invest. 85:1248-54.
11. Ing M. B., Baddour L. M., Bayer A. S. 1997. Bacteremia and infective endocarditis: pathogenesis, diagnosis and complications, p. 331-54. In Crossley K. B., Archer G. L. (eds.), The staphylococci in human disease. Churchill Livingstone, New York, USA.

12. Patti J. M., Bremell T., Krajewska-Pietrasik D. et al. 1994. The *Staphylococcus aureus* collagen adhesin is a virulence determinant in experimental septic arthritis. *Infect. Immun.* 62:152-61.
13. Cheung A. L., Fischetti V. A. 1990. The role of fibrinogen in staphylococcal adherence to catheters in vitro. *J Infect. Dis.* 161:1177-86.
14. Vaudaux P., Pittet D., Haerberli A. et al. 1993. Fibronectin is more active than fibrin or fibrinogen in promoting *Staphylococcus aureus* adherence to inserted intravascular catheters. *J Infect. Dis.* 167:633-41.
15. Tsao M. M., Katz D. 1984. Central venous catheter-induced endocarditis: human correlate of the animal experimental model of endocarditis. *Rev Infect. Dis.* 6:783-90.
16. Steinberg J. P., Clark C. C., Hackman B. O. 1996. Nosocomial and community-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremias from 1980 to 1993: impact of intravascular devices and methicillin resistance. *Clin Infect. Dis.* 23:255-9.
17. Domínguez M. A., de Lencastre H., Linares J., Tomasz A. 1994. Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in a Spanish hospital. *J Clin. Microbiol.* 32:2081-7.
18. Sanches I. S., Ramírez M., Troni H. et al. 1995. Evidence for the geographic spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone between Portugal and Spain. *J Clin. Microbiol.* 33:1243-6.
19. Casewell M. W., Hill R. L. R. 1986. The carrier state: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 18: Suppl. A:1-12.
20. Kluytmans J., van Belkum A., Verbrugh H. 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev.* 10:505-20.
21. Emori T.G., Gaynes R.P. 1993. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev.* 6:428-42.
22. R.N., Beach M. SENTRY Participants Group. 2001. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis.* 32 Suppl 2:S114-132.
23. CDC NNIS System: National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, Data Summary from January 1992-June 2001, issued August 2001. *Am J Infect Control.* 29:404-21.

24. Vincent J.L., Bihari D.J., Suter P.M., Bruining H.A., White J, Nicolas-Chanoin M.H., Wolff M., Spencer R.C., Hemmer M. 1995. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. JAMA 274:639-44.
25. Spencer R. C. 1996. Predominant pathogens found in the European Prevalence of Infection in Intensive Care Study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 15:281-5.
26. Mylotte J. M., McDermott C., Spooner J. A. 1987. Prospective study of 114 consecutive episodes of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Rev. Infect. Dis. 9:891-907.
27. Speller D.C.E., Johnson A.P., James D., Marples R.R., Charlett A., George R.C. 1997. Resistance to methicillin and other antibiotics in isolates of *Staphylococcus aureus* from blood and cerebrospinal fluid, England and Wales, 1989-95. Lancet 350:323-25.
28. Voss A., Milatovic D., Wallrauch-Schwarz C., Rosdahl V. T., Braveny I. 1994. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. Eur J Clin. Microbiol. Infect. Dis. 13:50-5.
29. CDC NNIS System: National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, Data Summary from January 1992-June 2002, issued August 2002. Am J Infect Control. 30:458-75.
30. Oteo J., Cruchaga S., Campos J., Saez J.A., Baquero F y miembros del Grupo del European Antimicrobial Resistance Surveillance System. 2002. Resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus* aislados de sangre en 31 hospitales españoles de la Red Europea de Vigilancia de Resistencia a Antibióticos (2000). Med Clin (Barcelona) 119: 361-365.
31. Stefani S., Varaldo P. E. 2003. Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in Europe. Clin Microbiol Infect. 9:1179-86.
32. Thompson R.L., Cabezudo I., Wenzel R.P. 1982. Epidemiology of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Ann Intern. Med. 97:309-17.
33. Gross-Schulman S., Dassey D., Mascola L., Anaya C. 1998. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. JAMA 280:421-2.
34. Chambers, H. F. 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? Emerg Infect Dis. 7:178-82.
35. Naimi T.S., LeDell K.H., Como-Sabetti K., et al. 2003. Comparison of Community- and Health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. JAMA 290:2976-84.

36. Fridkin S.K., Hageman J.C., Morrison M., *et al.* 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. *N Eng J Med.* 352:1436-44.
37. Walsh T.R., Howe R.A. 2002. The prevalence and mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol.* 56:657-75.
38. Ruef, C. 2004. Epidemiology and clinical impact of glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Infection* 32:315-27.
39. Smith T.L., Jarvis W.R. 1999. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect.* 1:795-805.
40. Hiramatsu K., Aritaka N., Hanaki H., *et al.* 1997. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 350:1670-1673.
41. Bert F., Clarissou J., Durand F., *et al.* 2003. Prevalence, molecular epidemiology, and clinical significance of heterogeneous glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* in liver transplant recipients. *J Clin Microbiol.* 41:5147-52.
42. Howe R.A., Wootton M., Walsh T.R., *et al.* 1999. Expression and detection of hetero-vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 44:675-8.
43. Liñares J. 2001. The VISA/GISA problem: therapeutic implications. *Clin Microbiol Infect.* 7 (Suppl 4):8-15.
44. Fekety R. 2000. Vancomycin, teicoplanin and the strptogramins: quinupristin-dalfopristin. En Mandell G.L., Bennett J.E. and Dolin R. (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 5<sup>th</sup> edition, p. 382-392. Churchill Livingstone, New York, USA.
45. Monroe S.G., Polk R. 1999. Vancomycin. En Yu V.L., Merigan Jr T.C. and Barriere S.L. (eds). *Antimicrobial Therapy and Vaccines*, p. 1007-18. Williams and Wilkins, Baltimore, Md., USA.
46. Monroe S.G., Polk R. 1999. Teicoplanin. En Yu V.L., Merigan Jr T.C. and Barriere S.L. (eds). *Antimicrobial Therapy and Vaccines*, p. 978-981. Williams and Wilkins, Baltimore, Md., USA.
47. Sábada Díaz de Rada B., Azanza Perea J.R., García Quetglas E., Honorato Pérez J. 1998. Glucopéptidos: vancomicina y teicoplanina. En *Medicine*, 7:3329-36. Ediciones Doyma, S.L. Barcelona. Spain.
48. Pigrau C. 2003. Oxazolidinonas y glucopéptidos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21:157-64.

- 
49. Gonzalez-Zorn B., Courvalin P. 2003. VanA-mediated high level glycopeptide resistance in MRSA. *Lancet Infect Dis.* 3:67-8.
  50. Hanaki H., Kuwahara-Arai K., Boyle-Vavra S., Daum RS., Labischinski H., Hiramatsu K. 1998. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *Antimicrob Chemother.* 42:199–209.
  51. Hanaki H., Labischinski H., Inaba Y., Kondo N., Murakami H., Hiramatsu K. 1998. Increase in glutamine-non-amidated mucopeptides in the peptidoglycan of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain Mu50. *J Antimicrob Chemother.* 42:315–20.
  52. Kuroda M., Kuwahara-Arai K., Hiramatsu K. 2000. Identification of the up- and down-regulated genes in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains Mu3 and Mu50 by cDNA differential hybridization method. *Biochem Biophys Res Commun.* 269:485–90.
  53. Bobin-Dubreux S., Reverdy M.E., Nervi C., Rougier M., Bolmstrom A. *et al.* 2001. Clinical isolate of vancomycin-hetero intermediate *Staphylococcus aureus* susceptible to methicillin and in vitro selection of a vancomycin-resistant derivative. *Antimicrob Agents Chemother.* 45:349–52.
  54. Maki H., McCallum N., Bischoff M., Wada A., Berger-Bachi B. 2004. *tcaA* inactivation increases glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:1953-9.
  55. Sakoulas G., Eliopoulos G.M., Moellering R.C. Jr., Novick R.P., Venkataraman L. *et al.* 2003. *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator (*agr*) group II: is there a relationship to the development of intermediate-level glycopeptide resistance? *J Infect Dis.* 187:929-38.
  56. Sakoulas G., Eliopoulos G.M., Moellering R.C. Jr., Wennersten C., Venkataraman L. *et al.* 2002. Accessory gene regulator (*agr*) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 46:1492-502.
  57. Kaatz G.W., Seo S.M., Dorman N.J., Lerner S.A. 1990. Emergence of teicoplanin resistance during therapy of *Staphylococcus aureus* endocarditis. *J Infect Dis.* 162:103–08.
  58. Brunet G., Vedal G., Dreyfus F., Vaxelaire F., Giraud T. *et al.* 1990. Failure of teicoplanin therapy in two neutropenic patients with staphylococcal septicaemia who recovered after administration of vancomycin. *Eur J Clin Microb Infect Dis.* 9:145–47.

59. Shlaes D.M., Shlaes J.H., Vincent S., Etter L., Fey P.D., Goering R.V. 1993. Teicoplanin-resistant *Staphylococcus aureus* expresses a novel membrane protein and increases expression of penicillin-binding protein 2 complex. *Antimicrob Agents Chemother.* 37:2432-37.
60. Van Bambeke F., Van Laethem Y., Courvalin P., Tulkens P. 2004. Glycopeptide antibiotics: from conventional molecules to new derivatives. *Drugs* 64:913-36.
61. Craig W.A. 1998. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis.* 26:1-12.
62. Peetermans W. E., Hoogeterp J. J., Hazekamp-van Dokkum A-M., van den Broek P., Mattie H. 1990. Antistaphylococcal activities of teicoplanin and vancomycin in vitro and in an experimental infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:1869-1874.
63. Chambers H.F., Kennedy S. 1990. 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.* 34:510-4.
64. Lutsar I., McCracken GH. Jr, Friedland I.R. 1998. Antibiotic pharmacodynamics in cerebrospinal fluid. *Clin Infect Dis.* 27:1117-27.
65. Knudsen J.D., Fuursted K., Raber S., Espersen F., Frimodt-Moller N. 2000. Pharmacodynamics of glycopeptides in the mouse peritonitis model of *Streptococcus pneumoniae* or *Staphylococcus aureus* infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 44:1247-54.
66. Hyatt J.M., McKinnon P.S., Zimmer G.S., Schentag J.J. 1995. The importance of pharmacokinetic/pharmacodynamic surrogate markers to outcome. Focus on antibacterial agents. *Clin Pharmacokinet.* 28:143-60.
67. Craig W.A. 2003. Basic pharmacodynamics of antibacterials with clinical applications to the use of beta-lactams, glycopeptides, and linezolid. *Infect Dis Clin North Am.* 17:479-501.
68. Schentag J.J. 1999. Antimicrobial action and pharmacokinetics / pharmacodynamics: the use of AUC to improve efficacy and avoid resistance. *J Chemother.* 11:426-39.
69. Chambers H. F. 1988. Methicillin-Resistant Staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 1:173-186.
70. Lowy F. D. 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest.* 111:1265-73.



- 
71. Gopal V., Bisno A.L., Silverblatt F.J. 1976. Failure of vancomycin treatment in *Staphylococcus aureus* endocarditis. In vivo and in vitro observations. JAMA 236:1604-6.
  72. Small P.M., Chambers H.F. 1990. Vancomycin for *Staphylococcus aureus* endocarditis in intravenous drug users. Antimicrob Agents Chemother. 34:1227-31.
  73. Chambers H.F., Sande M.A. 1984. Teicoplanin versus nafcillin and vancomycin in the treatment of experimental endocarditis caused by methicillin-susceptible or -resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 26:61-4.
  74. Cosgrove S.E., Sakoulas G., Perencevich E.N., et al. 2003. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. Clin Infect Dis. 36:53-9.
  75. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Vol. 17. Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 2000.
  76. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T et al. 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J Antimicrob Chemother. 40:135-46.
  77. Centers for Disease Control and Prevention. 1997. Update: *S.aureus* with reduced susceptibility to vancomycin-United States, 1997. Morb Mortal Wkly Rep. 46:813-815.
  78. Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR et al. 1999. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. N Engl J Med. 340:493-501.
  79. Ploy MC, Grelaud C, Martin C et al. 1998. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. Lancet 351:1212.
  80. Denis O., Nonhoff C., Byl B., Knoop C., Bobin-Dubreux S., Struelens M.J. 2002. Emergence of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a Belgian hospital: microbiological and clinical features. J Antimicrob Chemother. 50:383-91.
  81. Kim MN, Pai CH, Woo JH et al. 2000. Vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* in Korea. J Clin Microbiol. 38:3879-3881.
  82. McManus J. 1999. Vancomycin resistant staphylococcus reported in Hong Kong. Br Med J. 318:626.
  83. Hiramatsu K. 2001. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. Lancet Infect Dis. 1:147-55.

84. Ariza J., Pujol M., Cabo J. *et al.* 1999. Vancomycin in surgical infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin. *Lancet* 353:1587-88.
85. Moore M.R., Perdreau-Remington F., Chambers H.F. 2003. Vancomycin treatment failure associated with heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a patient with endocarditis and in the rabbit model of endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* 47:1262-66.
86. Fridkin S.K., Hageman J., McDougal L.K., Mohammed J., Jarvis W.R., Perl T.M., Tenover F.C. 2003. Epidemiological and microbiological characterization of infections caused by *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin, United States, 1997-2001. *Clin Infect Dis.* 36:429-39.
87. Geisel R., Schmitz F.J., Thomas L. *et al.* 1999. Emergence of heterogeneous intermediate vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates in the Dusseldorf area. *J Antimicrob Chemother.* 43: 846-48.
88. Guerin F., Buu-Hoï A., Mainardi J.L. *et al.* 2000. Outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides in a Parisian hospital. *J Clin Microbiol.* 38: 2985-8.
89. Kantzanou M., Panayotis T.T., Tseleni-Kotsovili A., Legakis N.J., Vatopoulos A.C. 1999. Reduced susceptibility to vancomycin of nosocomial isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother;* 43: 729-31.
90. Marchese A., Balistreri G., Tonoli E., Debbia A., Schito G.C. 2000. Heterogeneous vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in a large Italian hospital. *J Clin Microbiol.* 38: 866-9.
91. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2002. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin—United States, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 51:565-7.
92. Chang S, Sievert D.M., Hageman J.C., Boulton M.L., Tenover F.C., Downes F.P., Shah S., Rudrik J.T., Pupp G.R., Brown W.J., Cardo D., Fridkin S.K.; Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Investigative Team. 2003. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. *N Engl J Med.* 348:1342-7.
93. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2002. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*—Pennsylvania, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 51:902.
94. Tenover F.C., Weigel L.M., Appelbaum P.C. *et al.* 2004. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:275-80.

- 
95. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2004. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*— New York, 2004. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 53:322–3.
  96. Mesa Española de Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos (MENSURA). 2000. Recommendations from MENSURA for selection of antimicrobial agents for susceptibility testing and criteria for the interpretation of antibiograms. Rev Esp Quimioterap. 13:73–86.
  97. British Society for Antimicrobial Chemotherapy. 1998. Revised guidelines for the control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in hospitals. J Hosp Infect. 39:253–90.
  98. Olsson-Iiljequist B, Larsson P, Walder M, Miörner H. 1997. Antimicrobial susceptibility testing in Sweden. Scand J Infect Dis. 105(S):13–23.
  99. Tenover FC. 2000. VRSA, VISA and GISA. the dilemma behind the name game. Clin Microbiol Newsletter 22:49–53.
  100. Sieradzki K., R.B. Roberts, S.W. Haber, and A. Tomasz. 1999. The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. N. Engl. J. Med. 340:517-523.
  101. Cui L., Murakami H., Kuwahara-Arai K., Hanaki H., Hiramatsu K. 2000. Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. Antimicrob. Agents Chemother. 44:2276–85.
  102. Cui L., Ma X., Sato K., Okuma K., Tenover F.C. *et al.* 2003. Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 41:5-14.
  103. Boyle-Vavra S., Berke S.K., Lee J.C., Daum R.S. 2000. Reversion of the glycopeptide resistance phenotype in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother. 44:272-7.
  104. Pfeltz R.F., Singh V.K., Schmidt J.L. 2000. Characterization of passage-selected vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains of diverse parental backgrounds. Antimicrob Agents Chemother. 44:294-303.
  105. Rotun S.S., McMath V., Schoonmaker D.J., Maupin P.S., Tenover F.C. *et al.* 1999. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin isolated from a patient with fatal bacteremia. Emerg Infect Dis. 5:147-9.
  106. Walsh T.R., Bolmstrom A., Qvarnstrom A., Ho P., Wootton M., Howe R.A. *et al.* 2001. Evaluation of current methods for detection of staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides. J Clin Microbiol. 39:2439-44.

107. Tenover F.C., Lancaster M.V., Hill B.C., Steward C.D., Stocker S.A. 1998. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. *J Clin Microbiol.* 36:1020-7.
108. Hubert S.K., Mohammed J.M., Fridkin S.K., Gaynes R.P, McGowan J.E. Jr, Tenover F.C. 1999. Glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*: evaluation of a novel screening method and results of a survey of selected U.S. hospitals. *J Clin Microbiol.* 37:3590-3.
109. Charles P.G., Ward P.B., Johnson P.D., Howden B.P., Grayson M.L. 2004. Clinical features associated with bacteremia due to heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.* 38:448-51.
110. Howden B.P., Ward P.B., Charles P.G., Korman T.M., Fuller A. *et al.* 2004. Treatment outcomes for serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility. *Clin Infect Dis.* 38:521-8.
111. Cosgrove S.E., Carroll K.C., Perl T.M. 2004. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. *Clin Infect Dis.* 39:539-45.
112. Fridkin S.K. 2001. Vancomycin-intermediate and -resistant *Staphylococcus aureus*: what the infectious disease specialist needs to know. *Clin Infect Dis.* 32:108-15.
113. Rybak M.J., Hershberger E., Moldovan T., Gruz R. G. 2000. *In vitro* activities of daptomycin, vancomycin, linezolid, and quinupristin-dalfopristin against Staphylococci and Enterococci, including vancomycin-intermediate and -resistant strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 44:1062-6.
114. Yanagihara K., Kaneko Y., Sawai T., Miyazaki Y., Tsukamoto K. *et al.* 2002. Efficacy of linezolid against methicillin-resistant or vancomycin-insensitive *Staphylococcus aureus* in a model of hematogenous pulmonary infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 46:3288-91.
115. Andrade-Baiocchi S., Tognim M.C., Baiocchi O.C., Sader H.S. 2003. Endocarditis due to glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*: case report and strain characterization. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 45:149-52.
116. Domaracki B.E., Evans A.M., Venezia R.A. 2000. Vancomycin and oxacillin synergy for methicillin-resistant staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 44:1394-96.
117. Hanaki H., Hiramatsu K. 1999. Combination effect of teicoplanin and various antibiotics against hetero-VRSA and VRSA. *Kansenshogaku Zasshi [Japonés]* 73:1048-53.

118. Howe R.A., Wootton M., Bennett P.M. *et al.* 1999. Interactions between methicillin and vancomycin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains displaying different phenotypes of vancomycin susceptibility. *J Clin Microbiol.* 37:3068-71.
119. Lozniewski A., Lion C., Mory F. *et al.* 2001. In vitro synergy between cefepime and vancomycin against methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother.* 47:83-6.
120. Seibert G., Isert D., Klesel N. *et al.* 1992. The in-vitro antibacterial activity of a combination of cefpirome or cefoperazone with vancomycin against enterococci and *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 29 Suppl A:25-30.
121. Climo W.M., Patron R.L., Archer G.L. 1999. Combinations of vancomycin and  $\beta$ -lactams are synergistic against staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 43:1747-53.
122. Sieradzki K., Tomasz A. 1997. Suppression of  $\beta$ -lactam antibiotic resistance in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* through synergic action of early cell wall inhibitors and some other antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* 39 Suppl A:47-51.
123. Sieradzki K., Tomasz A. 1997. Inhibition of cell wall turnover and autolysis by vancomycin in a highly vancomycin-resistant mutant of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 179:2557-66.
124. Sieradzki K., Tomasz A. 1999. Inactivation of the methicillin resistance gene *mecA* in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microb Drug Resist.* 5:253-7.
125. Aritaka N., Hanaki H., Cui L. *et al.* 2001. Combination effect of vancomycin and  $\beta$ -lactams against *Staphylococcus aureus* strain, Mu3, with heterogeneous resistance to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 45:1292-94.
126. Goldstein F.W., Atoui R., Ben Ali A. *et al.* 2004. False synergy between vancomycin and beta-lactams against glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* (GISA) caused by inappropriate testing methods. *Clin Microbiol Infet.* 10:342-45.
127. Haraga I., Nomura S., Nagayama A. 1999. The effects of vancomycin and  $\beta$ -lactam antibiotics on vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med.* 341:1624.
128. Beam T.R., Gilbert D.N., Kunin C.M. 1992. General guidelines for the clinical evaluation of anti-infective drug products. *Clin Infect Dis.* 15 (Suppl.1):S5-S32.
129. Beam T.R., Gilbert D.N., Kunin C.M., the European Working Party (eds). 1993. European Guidelines for the Clinical Evaluation of Anti-Infective Drug Products. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

130. Zak O., Sande M., O'Reilly T. 1999. Introduction: The Role of Animal Models in the Evaluation of New Antibiotics. En Zak O. and Sande M.A. (eds). Handbook of Animal Models of Infection, p.xxi-xxiv. Academic Press, London, UK.
131. Bergeron M.G. 1978. A review of models for the therapy of experimental infections. Scand J Infect Dis. 14 (Suppl.):189-206.
132. Zak O., Sande M.A. 1982. Correlation of in vitro antimicrobial activity of antibiotics with results of treatment in experimental animal models and human infection. En Action of Antibiotics in Patients, p.55-67. Ed. Sabath L.D., Hans Huber, Berne, C.H.
133. Frimodt-Moller N., Knudsen J.D., Espersen F. 1999. The Mouse Peritonitis/Sepsis Model. En Zak O. and Sande M.A. (eds). Handbook of Animal Models of Infection, p.127-136. Academic Press, London, UK.
134. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically - Fifth Edition: Approved Standard M7-A5. NCCLS, Villanova, PA, USA.
135. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1992. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents-Tentative Guideline: NCCLS Document M26-T. NCCLS, Villanova, PA, USA.
136. Frimodt-Moller N. 1993. The mouse peritonitis model: present and future use. J Antimicrob Chemother. 31 (Suppl D): 55-60.
137. Knudsen J. D., Fuursted K., Espersen F., Frimodt-Moller N. 1997. Activities of vancomycin and teicoplanin against penicillin-resistant pneumococci in vitro and in vivo and correlation to pharmacokinetic parameters in the mouse peritonitis model. Antimicrob Agents Chemother. 41:1910-1915.
138. Mattie H., Zhang L. C., van Strijen E., Sekh B. R., Douwes-Idema A. E. 1997. Pharmacokinetic and pharmacodynamic models of the antistaphylococcal effects of meropenem and cloxacillin in vitro and in experimental infection. Antimicrob. Agents Chemother. 41:2083-2088.
139. Pitkin D.H., Mico B.A., Sitrin R.D., Nisbet L.J. 1986. Charge and lipophilicity govern the pharmacokinetics of glycopeptide antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 29:440-444.
140. Sauve C., Azoulay-Dupuis E., Moine P., Darras-Joly C., Rieux V. *et al.* 1996. 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. 40:2829-2834.

- 
141. Tateda K., Takashima K., Miyazaki H., Matsumoto T., Hatori T., Yamaguchi K. 1996. Noncompromised penicillin-resistant pneumococcal pneumonia CBA/J mouse model and comparative efficacies of antibiotics in this model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:1520-1525.
  142. Torney H. L., Balistreri F. J., Kenny M. T., Cheng W. D. 1991. Comparative therapeutic efficacy of teicoplanin and vancomycin in normal and in neutropenic mice infected with *Staphylococcus haemolyticus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 28:261-269.
  143. Chapin-Robertson K., Edberg S. C. 1991. Measurements of antibiotics in human body fluids: techniques and significance. In Lorian V. (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*, pp. 295-366. Williams and Wilkins, New York, USA.
  144. Mouton J.W., van Ogtrop M.L., Andes D., Craig W.A. 1999. Use of pharmacodynamic indices to predict efficacy of combination therapy in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* 43:2473-8.
  145. Brunet F., Vedel G., Dreyfus F., Vaxelaire J.F., Giraud T. 1990. Failure of teicoplanin therapy in two neutropenic patients with staphylococcal septicemia who recovered after administration of vancomycin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 9:145-7.
  146. Pavie J., Lefort A., Ploy M.C., Massias L., Chau F. *et al.* 2003. Influence of reduced susceptibility to glycopeptides on activities of vancomycin and teicoplanin against *Staphylococcus aureus* in experimental endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:2018-2021.
  147. Gilbert D.N., Wood C.A., Kimbrough R.C., and the Infectious Diseases Consortium of Oregon. 1991. Failure of treatment with teicoplanin at 6 milligrams/kilogram/day in patients with *Staphylococcus aureus* intravascular infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:79-87.
  148. Levine D.P., Fromm B.S., Reddy B.R. 1991. Slow response to vancomycin or vancomycin plus rifampin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Ann. Intern Med.* 115: 674-80.

