

UNIVERSITAT DE BARCELONA  
Facultat de Medicina  
Departament de Ciències Clíniques



ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA EFICACIA DE MEROPENEM Y  
RIFAMPICINA EN EL TRATAMIENTO DE LA MENINGITIS  
NEUMOCOCICA SENSIBLE Y RESISTENTE A  $\beta$ -LACTÁMICOS

**Dirigida por:**  
**Dra. Carmen Cabellos**  
**Dr. Francisco Gudiol**

**Memoria presentada por**  
**ENRIQUETA FORCE SANMARTIN**  
**para optar al título de Doctora por la Universitat de Barcelona**

**Barcelona, 2008**



Los estudios han sido financiados por el

**Fondo de Investigaciones Sanitarias**

**Ministerio de Sanidad**

Beca FIS 02/0069



## PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

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

### Comunicaciones en congresos

1. **Force E**, Taberner F, Cabellos C, Domenech A, Ribes S, Tubau F, Viladrich P, Gudiol F. Experimental Study of Meropenem Alone and Combined with Rifampin in the Therapy of Guinea Pig Cephalosporin-Resistant Pneumococcal Meningitis. 44<sup>th</sup> ICAAC (Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy). Washington, 30 octubre-2 noviembre 2004.
2. **Force E**, Taberner F, Cabellos C, Doménech A, Ribes S, Tubau F, Viladrich PF, Gudiol F. Evaluación de meropenem solo y combinado con rifampicina en la meningitis neumocócica en la cobaya. XII Congreso SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica). Valencia, 10-13 mayo 2006.
3. **Force E**, Taberner F, Cabellos C, Ribes S, Doménech A, Tubau F, Viladrich PF, Gudiol F. Estudio experimental de meropenem solo y combinado con rifampicina en la meningitis neumocócica resistente a cefalosporinas. XII Congreso SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica). Valencia, 10-13 mayo 2006.

### Publicaciones en revistas indexadas

**Force E**, Taberner F, Cabellos C, Ribes S, Domenech A, Tubau F, Viladrich PF, Gudiol F. Experimental study of meropenem in the therapy of cephalosporin susceptible and resistant pneumococcal meningitis. Eur J Clin Microbiol 2008; 27:685-690.



# Índice



## Abreviaturas

<b>Actualidad del tema y justificación del estudio</b>	<b>15</b>
<b>I. Introducción</b>	<b>19</b>
1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	21
1.1. Antecedentes históricos	21
1.2. Características microbiológicas	22
1.3. Características estructurales	22
1.4. Epidemiología de la infección neumocócica	24
1.5. Patogenia de la enfermedad neumocócica	26
1.6. Profilaxis de la infección neumocócica	27
1.7. Sensibilidad antibiótica	28
1.7.1. Aspectos generales y mecanismos de control	28
1.7.2. Tipos de resistencia a los antibióticos	32
1.7.3. Resistencia a la penicilina	33
1.7.4. Resistencia a cefalosporinas de tercera generación	36
1.7.5. Multirresistencia	37
2. Meningitis neumocócica	39
2.1. Epidemiología	39
2.1.1. Pronóstico y complicaciones	40
2.2. Patogenia y fisiopatología	41
2.3. Tratamiento	49
2.3.1. Principios básicos	49
2.3.2. Tratamiento antimicrobiano	51
2.3.3. Tratamiento antiinflamatorio	55
3. Modelos de infección experimental	58
3.1. Experimentación animal e investigación	58
3.2. Modelos animales de meningitis	59
3.3. Modelo de meningitis en el conejo	61
3.4. Modelo de meningitis en la cobaya	62
4. Antibióticos	64
4.1. Meropenem	64
4.2. Rifampicina	68

<b>II. Hipótesis de trabajo y Objetivos</b>	71
1. Hipótesis de trabajo	73
2. Objetivos	74
<b>III. Diseño del estudio</b>	75
1. Cepas de estudio	77
2. Estudios <i>in vitro</i> : curvas de letalidad	79
3. Modelo de meningitis en el conejo	81
3.1. Animales	81
3.2. Modelo experimental	81
3.3. Procesamiento de muestras	88
4. Modelo de meningitis en la cobaya	92
4.1. Animales	92
4.2. Modelo experimental	92
4.3. Procesamiento de muestras	96
5. Análisis estadístico	97
<b>IV. Resultados</b>	99
1. Actividad <i>in vitro</i> de los antibióticos	101
1.1. Curvas de letalidad cepa HUB SIII	101
1.2. Curvas de letalidad cepa HUB 2349	103
2. Capacidad de generar meningitis en el modelo del conejo	105
3. Capacidad de generar meningitis en el modelo de la cobaya	107
4. Parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos	109
4.1. Farmacocinética en el conejo	109
4.2. Farmacocinética en la cobaya	111
5. Eficacia terapéutica y respuesta inflamatoria en el conejo	113
5.1. Eficacia terapéutica cepa HUB SIII	113
5.2. Respuesta inflamatoria cepa HUB SIII	115
5.3. Eficacia terapéutica cepa HUB 2349	116
5.4. Respuesta inflamatoria cepa HUB 2349	118
5.5. Niveles de antibiótico en el LCR del conejo	119
6. Comparación entre cepas en el modelo del conejo	120

7. Eficacia terapéutica y respuesta inflamatoria en la cobaya	124
7.1. Eficacia terapéutica cepa HUB SIII	124
7.2. Respuesta inflamatoria cepa HUB SIII	126
7.3. Eficacia terapéutica cepa HUB 2349	127
7.4. Respuesta inflamatoria cepa HUB 2349	129
7.5. Niveles de antibiótico en el LCR de la cobaya	130
8. Comparación entre cepas en el modelo de la cobaya	131
<b>V. Discusión</b>	135
1. Modelos de meningitis experimental	137
2. Eficacia de meropenem y rifampicina en el modelo del conejo	140
3. Eficacia de meropenem y rifampicina en el modelo de la cobaya	143
4. Congruencia entre el modelo del conejo y de la cobaya	144
5. Actividad <i>in vitro</i> de meropenem y rifampicina	144
6. Consideraciones finales	148
<b>VI. Conclusiones</b>	149
<b>VII. Bibliografía</b>	153
<b>VIII. Anexo</b>	177



## **ABREVIATURAS**

AUC=ABC:	Area under the curve (área bajo la curva)
BHE:	Barrera hematoencefálica
C3G:	Cefalosporinas de tercera generación
CDC:	Centers for Disease Control and Prevention
CLSL:	Clinical and Laboratory Standards Institute
C <sub>max</sub> :	Concentración máxima
CMI:	Concentración mínima inhibitoria
CMB:	Concentración mínima bactericida
CRO:	Ceftriaxona
DHP-I:	Dehidropeptidasa I
DO:	Densidad óptica
FAP:	Factor activador plaquetario
FDA:	Food and Drug Administration
IL:	Interleucina
LCR:	Líquido cefalorraquídeo
MPN:	Meropenem
PBP:	Penicillin-binding proteins (proteína fijadora de penicilina)
PEN:	Penicilina
PGE <sub>2</sub> :	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PK/PD:	Pharmacokinetic/pharmacodynamic (farmacocinético/dinámico)
RIF:	Rifampicina
SF:	Suero fisiológico
T <sub>1/2</sub> :	Vida media
TNF $\alpha$ :	Factor de necrosis tumoral alfa
TSA:	Tripticase soy agar (agar de tripticasa-soja)
TSB:	Tripticase soy broth (caldo de tripticasa-soja)
UFC:	Unidades formadoras de colonias



## ACTUALIDAD DEL TEMA Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

*Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) es un importante patógeno para el hombre, responsable de numerosas infecciones localizadas e invasivas, que constituye un serio problema de salud pública. Es la causa más frecuente de las infecciones del tracto respiratorio adquiridas en la comunidad incluyendo la sinusitis aguda, otitis media aguda y neumonía; además, es la principal causa de meningitis bacteriana en los adultos.

La meningitis neumocócica es una enfermedad grave que, a pesar de la administración de tratamiento antibiótico adecuado y de medidas generales de soporte, sigue asociándose a una elevada mortalidad (20-30%) que no ha variado sustancialmente en las dos últimas décadas. Hay que tener presente, también, que hasta el 30% de los pacientes que sobreviven presentan algún tipo de secuelas neurológicas muchas veces irreversibles<sup>1,2</sup>.

El tratamiento de la meningitis neumocócica constituye un problema no completamente resuelto. Durante muchos años la penicilina fue el tratamiento de elección, por su actividad bactericida y porque se necesitaban bajas concentraciones de antibiótico para inhibir la mayoría de cepas de *S. pneumoniae*. No obstante, en 1978 se describió la primera epidemia causada por neumococos con resistencia elevada a penicilina que se asoció a fracasos terapéuticos y a una alta mortalidad<sup>3</sup>. Desde entonces, la resistencia del neumococo a la penicilina se ha ido extendiendo a todo el mundo.

España fue uno de los primeros países que presentó una alta prevalencia de *S. pneumoniae* resistente a penicilina y otros antibióticos. En la década de los 90, alrededor del 40% de los aislamientos de neumococo en LCR eran resistentes a penicilina, mientras que la resistencia a cefalosporinas de tercera generación oscilaba entre un 3-20%<sup>4</sup>. Otro aspecto que viene a complicar todavía más el tratamiento de esta meningitis es el hecho de que neumococos resistentes a penicilina presentan en mayor o menor grado resistencia cruzada a otros  $\beta$ -lactámicos, y pérdida de sensibilidad a otros grupos antibióticos<sup>5</sup>. Aunque en los últimos años se ha observado un cierto descenso en el número de cepas

resistentes a la penicilina<sup>6,7</sup>, España sigue teniendo unas tasas de resistencia de las más elevadas de la UE<sup>8</sup>.

Durante mucho tiempo el tratamiento de elección de las meningitis neumocócicas ha sido las cefalosporinas de 3ª generación (cefotaxima y ceftriaxona) debido a su capacidad de alcanzar niveles elevados en LCR; sin embargo, se han descrito fracasos terapéuticos asociados a cepas con concentración mínima inhibitoria (CMI) > 1µg/ml<sup>9,10</sup>. La vancomicina había sido considerada como una buena alternativa para el tratamiento de las cepas resistentes a cefotaxima, pero también se han documentado algunos fracasos terapéuticos, debido a que los niveles alcanzados en LCR son erráticos y, además, las posibilidades de fallo terapéutico con vancomicina aumentan si se administra de forma concomitante con dexametasona<sup>11,12</sup>. También se han estudiado otros antibióticos no β-lactámicos con actividad antineumocócica como las nuevas quinolonas, con resultados variables<sup>13</sup>. A pesar de que en algunos estudios se ha observado efecto bactericida con rifampicina, el desarrollo de resistencias durante el tratamiento desaconseja su uso en solitario<sup>12,14</sup>.

El problema que se nos plantea es encontrar un tratamiento empírico seguro para la meningitis neumocócica, sea cual sea el grado de resistencia a β-lactámicos. Actualmente el tratamiento empírico más recomendado en zonas con una elevada prevalencia de cepas resistentes a penicilina es la combinación de una cefalosporina de 3ª generación con vancomicina, o bien con rifampicina<sup>15</sup>.

Los antibióticos carbapenémicos poseen una excelente actividad sobre *S. pneumoniae*, sin embargo el primero que surgió y con el que se posee una amplia experiencia, imipenem, no está indicado en el tratamiento de la meningitis ya que presenta como efecto secundario la aparición de convulsiones<sup>16</sup> y por la imposibilidad de utilizar dosis altas. Meropenem es un carbapenémico que tiene una buena actividad *in vitro* contra bacterias gram positivas y gram negativas, incluyendo cepas multirresistentes<sup>17</sup>. Posee una potente actividad bactericida y tiene una buena penetración en el LCR<sup>18</sup> y, a

diferencia de imipenem, no se han observado convulsiones con su administración, por lo que puede ser una buena alternativa para el tratamiento de la meningitis. De hecho se han realizado algunos estudios en meningitis por microorganismos multirresistentes en los que se ha observado una actividad del meropenem similar a la cefotaxima<sup>19,20</sup>.

Meropenem es estable frente a las dehidropeptidasas I (DHP-I) renales en los humanos y, a diferencia, de imipenem no requiere la administración conjunta de un inhibidor enzimático, la cilastina. No obstante, este comportamiento no es homogéneo en todas las especies animales comúnmente utilizadas en laboratorios de experimentación; meropenem es fácilmente hidrolizado en el conejo mientras que muestra mayor resistencia en el cobaya<sup>21</sup>. Se han realizado algunos estudios de meropenem en conejos con resultados desiguales<sup>22-24</sup>; por otro lado existe una pequeña experiencia en cobayas donde no parece existir problemas técnicos<sup>25</sup>.

Los modelos experimentales han sido de gran ayuda para estudiar el comportamiento de cepas de neumococo con resistencia a  $\beta$ -lactámicos, y para valorar la eficacia de los antibióticos en solitario y en combinación. No obstante, es muy importante utilizar el modelo animal adecuado en función del antibiótico que queramos estudiar.



## I. Introducción



## **1. *Streptococcus pneumoniae***

### **1.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS**

*Streptococcus pneumoniae* se descubrió simultáneamente por Pasteur en Francia y Sternberg en Estados Unidos en 1881 en aislamientos orofaríngeos. En 1886 Fraenkel le designó con el término *Peumococcus* al demostrar que era la causa más frecuente de neumonía lobar. En 1920, debido a la morfología que adquiría en la tinción de Gram, paso a llamarse *Diplococcus pneumoniae*. Por último, en 1974 se incluyó en el género *Streptococcus* y se le otorgó el nombre actual, *Streptococcus pneumoniae*<sup>26</sup>.

El conocimiento del *S. pneumoniae* como productor de enfermedad ha resultado ser uno de los hallazgos más importantes de la ciencia biomédica. Los estudios de Avery y colaboradores sobre la estructura, naturaleza química y propiedades inmunológicas de los antígenos capsulares clarificó su papel en la virulencia de esta bacteria y fueron la base para el desarrollo de la vacuna polisacárida, actualmente utilizada en los pacientes con alto riesgo de padecer enfermedad neumocócica invasiva. La investigación con este microorganismo ha hecho posible una mayor comprensión de la genética molecular, la resistencia a antibióticos y la inmunoprofilaxis con vacunas<sup>27</sup>.

El descubrimiento de la penicilina en 1940 supuso un avance decisivo en el tratamiento de la neumonía neumocócica, causa de muerte muy frecuente en aquella época. No obstante, a pesar de la gran cantidad de antimicrobianos que se dispone en la actualidad, la enfermedad neumocócica invasiva continúa teniendo una morbimortalidad elevada. El *S. pneumoniae* es la causa más frecuente de infecciones del tracto respiratorio adquiridas en la comunidad incluyendo la sinusitis aguda, otitis media aguda, exacerbaciones de bronquitis crónica y neumonías. También es la primera causa de meningitis bacterianas en los adultos.

## 1.2. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

*S. pneumoniae* o neumococo es un coco gram positivo encapsulado. Las células tienen un diámetro de 0,5 a 1,2  $\mu\text{m}$ , con forma ovalada o de lanceta, dispuestas en parejas unidas por el eje longitudinal o en cadenas cortas. Desde el punto de vista microbiológico, la identificación del neumococo en el laboratorio se basa en la presencia de  $\alpha$ -hemólisis en agar-sangre, en la ausencia de enzima catalasa, en la inhibición por la optoquina y la lisis en presencia de sales biliares.

Es un microorganismo anaerobio facultativo, no forma esporas y es inmóvil. Son exigentes para su crecimiento y multiplicación ya que necesitan un medio de cultivo rico en colina y con suplementos hematológicos. Crecen bien en medios enriquecidos con un 5% de sangre de cordero, en una atmósfera con un 5-10% de  $\text{CO}_2$  y a una temperatura de 37°C.

En medios sólidos como el agar sangre, a las 24-36 horas de incubación, los organismos jóvenes forman colonias redondas, lisas, brillantes y no pigmentadas, que en condiciones aeróbicas están rodeadas por un halo de  $\alpha$ -hemólisis. En general, cuando más grande sea la cápsula más grandes y más mucosas son las colonias (algunas pueden alcanzar un diámetro de 3 mm). Conforme van envejeciendo tienden a experimentar autólisis a causa de su susceptibilidad a los peróxidos producidos durante el crecimiento y a la acción de autolisinas, que primero convierten a la célula en gram negativa y después provocan su lisis<sup>28</sup>.

## 1.3. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES

La estructura de *S. pneumoniae* es compleja y se compone de una membrana plasmática recubierta por la pared celular y rodeando a ambas se encuentra la cápsula.

La **cápsula** polisacárida es el determinante fundamental de la virulencia del neumococo, porque inhibe la acción fagocitaria en el huésped y altera la actividad de la vía clásica del complemento. La cápsula se sintetiza en el

citoplasma como unidades de oligosacáridos que se polimerizan por uniones fosfodiesterasas y son transportadas al exterior de la célula donde se anclan a la pared celular, allí se unen de forma covalente con el peptidoglicano de la pared celular. Una vez constituida, la cápsula forma una cubierta externa mucoide que recubre toda la célula. La práctica totalidad de los neumococos que producen enfermedad poseen esta cápsula, formada por polisacáridos específicos que permiten la clasificación de *S. pneumoniae* en serotipos. De este modo, se han descrito 90 serotipos distintos atendiendo a las diferencias antigénicas de sus polisacáridos capsulares, que se identifican con sueros específicos por aglutinación o por una reacción de precipitación en su cápsula denominada reacción de Quellung<sup>29</sup>. En la actualidad, la clasificación danesa, que utiliza los antisueros procedentes del *Statens Serum Institut* de Copenhague, es la más aceptada. Esta clasificación emplea números correlativos para nombrar los diferentes serogrupos y una letra diferencial en cada grupo designa cada tipo específico. Cada serotipo es capaz de estimular la formación de anticuerpos específicos frente a los polisacáridos capsulares, que desencadenan una respuesta protectora específica en el huésped frente a la reinfección por cepas con el mismo tipo de polisacárido capsular.

La **pared celular** es una estructura rígida que rodea la membrana plasmática y que está formada por potentes factores proinflamatorios que activan la vía alternativa del complemento. El componente mayoritario de la pared celular son los peptidoglicanos a los que se unen proteínas, hidratos de carbono y lipoproteínas. La capa de peptidoglicano de la pared celular del neumococo es la característica de un coco grampositivo, tiene acción antigénica y es la diana de los antibióticos que actúan sobre la pared celular como los  $\beta$ -lactámicos. El otro componente fundamental de la pared celular es el ácido teicoico, el cual es rico en galactosamina, fosfato y colina. La colina es exclusiva de la pared de *S. pneumoniae*, y desempeña una importante función en la hidrólisis de la pared celular. Hay dos formas de ácido teicoico, una de ellas se halla expuesta en la superficie celular y se une a la capa de peptidoglicano constituyendo una estructura específica de especie llamada polisacárido C, la otra está unida de forma covalente a la membrana plasmática y recibe el nombre de antígeno de

Forssman. Este antígeno es un potente inhibidor de la autolisina neumocócica, la amidasa, lo que contribuye al control de la lisis bacteriana<sup>28,30</sup>.

Tal como se ha podido demostrar en la meningitis experimental, los fragmentos de la pared celular que contienen ácido teicoico desempeñan un papel primordial en la respuesta inflamatoria del huésped, provocando leucocitosis, aumento de la permeabilidad capilar y liberación de los mediadores de la cascada inmunológica como la interleucina 1 (IL-1) o el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), responsables del daño tisular que se produce en la meningitis y otras enfermedades neumocócicas<sup>31-33</sup>.

En la cara interna de la pared celular se encuentra la **membrana plasmática**, que se ajusta a las características de las membranas biológicas y está formada por una capa lipídica en cuyo interior se encuentran englobadas las moléculas protéicas, estas proteínas determinan importantes propiedades de virulencia de la bacteria. Las más importantes son: las autolisinas, cuya función natural es la degradación de la pared durante la división celular; la neuraminidasa y la hialurodinasa que contribuyen a la invasividad del germen; la neumolisina y algunos tipos de proteasas con capacidad proinflamatoria y también factor de invasividad<sup>34,35</sup>. Otro grupo de proteínas de la membrana son las proteínas fijadoras de penicilina (PBPs) que participan en la síntesis y organización del peptidoglicano durante la división celular.

#### **1.4. EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN NEUMOCÓCICA**

*S. pneumoniae*, como muchos otros microorganismos, coloniza con frecuencia la nasofaringe de las personas sanas, de forma que el 5-40% de la población dependiendo de la edad pueden ser portadores asintomáticos. Las tasas de colonización son más frecuentes durante el invierno y su mayor incidencia se registra en la infancia. El estado de portador es transitorio, aunque puede durar varias semanas<sup>36</sup>. La infección neumocócica se transmite de un individuo a otro por las secreciones respiratorias a partir de un contacto estrecho. La convivencia en comunidades cerradas, donde se produce hacinamiento, como guarderías, residencias de ancianos, cuarteles o cárceles, el riesgo de transmisión es mayor.

La infección neumocócica clínica también es más frecuente en los meses de invierno y, aunque se puede producir a lo largo de toda la vida, predomina en algunas edades. La enfermedad es más frecuente en niños y ancianos, ya que ambas poblaciones presentan concentraciones bajas de anticuerpos protectores dirigidos frente a los polisacáridos capsulares neumocócicos. La incidencia de enfermedad neumocócica invasiva varía según los países, pero está directamente relacionada con la edad. En los niños menores de 2 años es muy frecuente, con tasas de hasta 200 casos/100.000 habitantes. A partir de esta edad disminuye considerablemente la incidencia de la enfermedad para volver a incrementarse a partir de los 65 años, llegando a tasas de 70 casos/100.000 habitantes<sup>37-39</sup>. No obstante, en los últimos años se está observando una disminución de la enfermedad, tanto en niños como en ancianos, como consecuencia de la implantación de la vacunación antineumocócica<sup>40-42</sup>.

Los mecanismos de defensa del huésped frente a la infección neumocócica dependen sobretodo de factores humorales como la formación de anticuerpos y el complemento, y de la actividad de las células fagocitarias. Existen por tanto una gran variedad de factores que predisponen a la infección neumocócica como son: alteraciones en la formación de anticuerpos, mieloma múltiple, leucemia, linfoma, enfermos esplenectomizados o con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). El bazo ejerce un papel fundamental en el control de infecciones causadas por microorganismos capsulados, ya que es el principal lugar de depuración de neumococos de la circulación, de tal modo que la posibilidad de sufrir bacteriemia en un paciente esplenectomizado es muy superior a la población general, debido a la ausencia de inmunidad humoral eficaz. El HIV produce graves alteraciones en los mecanismos defensivos del huésped, aunque probablemente la afectación en la producción de anticuerpos sea el principal mecanismo de la alta incidencia de enfermedad neumocócica bacteriémica que se observa en estos pacientes. Si bien es cierto que desde la instauración del tratamiento antirretroviral de alta eficacia y de la administración de la vacuna neumocócica, la incidencia de enfermedades neumocócicas graves ha descendido notablemente<sup>43,44</sup>.

La mayor susceptibilidad que presentan las personas de edad avanzada tiene probablemente un origen multifactorial. El hábito de fumar, el alcoholismo o enfermedades crónicas como la diabetes mellitus, la insuficiencia renal crónica, la insuficiencia cardíaca y la insuficiencia respiratoria crónica condicionan un riesgo aumentado de padecer infecciones neumocócicas. La enfermedad neumocócica es más frecuente y más grave en personas con ciertas comorbilidades. En un estudio publicado recientemente se ha observado que la incidencia de enfermedad neumocócica invasiva en adultos sanos es de 8,8 casos/100.000 personas; 51,4 en adultos con diabetes, 62,9 en adultos con enfermedad pulmonar crónica, 93,7 en adultos con enfermedad cardíaca crónica y 100,4 en pacientes alcohólicos. Los grupos de mayor riesgo lo constituyen los pacientes con tumores sólidos, con infección por HIV y los pacientes con neoplasias hematológicas<sup>45</sup>.

Desde el punto de vista epidemiológico es importante conocer cuáles son los serotipos más prevalentes que ocasionan enfermedad invasiva en una determinada zona geográfica, para saber el grado de resistencia de los mismos a la penicilina y si están incluidos o no en la vacuna polisacárida actualmente comercializada. Los serotipos que se aislaron en la enfermedad neumocócica invasiva con mayor frecuencia en España durante el periodo 2000-2002 fueron: 14, 3, 19, 6, 1, 9, 23, 4 y 8. El 89% eran serotipos incluidos en la vacuna polisacárida 23-valente actualmente comercializada. La mayoría de los neumococos de los serotipos 6, 9, 14, 19 y 23 son resistentes a la penicilina y a otros grupos de antibióticos. El serotipo 3, es el que se aísla con mayor frecuencia en infecciones sistémicas en pacientes adultos en España, y sigue siendo sensible a la penicilina y otros antibióticos. Mientras que en los niños los serotipos 14, 6, 1 y 19, resistentes a múltiples antibióticos, son los que se asocian en nuestro país a infecciones graves en los casos pediátricos<sup>6,46</sup>.

### **1.5. PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD NEUMOCÓCICA**

El neumococo ocasiona enfermedad por su resistencia a la fagocitosis y su capacidad de invadir y multiplicarse en los tejidos. El *S. pneumoniae* se adhiere a las células epiteliales respiratorias por medio de adhesinas de superficie. Los

mecanismos defensivos del tracto respiratorio como los reflejos epiglótico y tusígeno o la actividad mucociliar, impiden la llegada del microorganismo a otras áreas como el oído medio, senos o alvéolos. Cuando estos mecanismos fallan por pérdida de la integridad del epitelio respiratorio (infecciones víricas, tabaquismo o agentes irritantes) o porque se produce una aspiración de las secreciones orofaríngeas, favorecida por el alcohol, anestesia, sedación o senilidad, las bacterias llegan a los alvéolos donde se multiplican activamente.

La cápsula del neumococo tiene un papel primordial en la patogenia de la enfermedad ya que bloquea la fagocitosis por parte del huésped, contribuyendo a la progresión de la infección. Además, otros factores de virulencia como la neumolisina, autolisinas y otros componentes de la pared celular activan la vía del complemento y son responsables de la lesión tisular que se produce en la enfermedad. La extensión y la gravedad de la neumonía dependen en gran medida de la capacidad defensiva del huésped, pero también de la intensidad de la respuesta inflamatoria generada por los fragmentos de pared celular resultantes de la lisis de la bacteria<sup>47,48</sup>.

Aunque la mayoría de neumococos de la lesión pulmonar son destruidos por la fagocitosis y la acción del complemento, algunos microorganismos pueden extenderse a otras zonas como la cavidad pleural o el pericardio, o bien pueden penetrar por la mucosa hasta alcanzar los linfáticos regionales, llegar al conducto torácico y de allí al torrente circulatorio. Una vez desarrollada la bacteriemia, los organismos pueden diseminarse a otras partes del cuerpo, especialmente en las meninges, las articulaciones, el peritoneo y el endocardio. Desde la nasofaringe el neumococo puede también ocasionar infecciones en las vías aéreas superiores como otitis media aguda o sinusitis, e incluso alcanzar los linfáticos cervicales, llegar a la circulación sistémica y provocar infección a distancia.

## **1.6. PROFILAXIS DE LA INFECCIÓN NEUMOCÓCICA**

En España existen dos vacunas antineumocócicas comercializadas. La primera lo hizo en 1983 y está compuesta de antígenos de polisacáridos capsulares de 23 serotipos de *S. pneumoniae*. Esta vacuna cubre aproximadamente el 80% de

los serotipos que causan infección neumocócica invasiva. La mayoría de las personas que son vacunadas responden con la elaboración de anticuerpos frente al 75% de los antígenos contenidos en la vacuna. En adultos jóvenes y sanos la vacuna es altamente eficaz y los anticuerpos persisten pasados 5 años. En pacientes ancianos, con enfermedades crónicas o alteraciones de la inmunidad, precisamente aquellos en los que es más necesario prevenir la enfermedad, la eficacia es menor; no obstante, actualmente todos los organismos recomiendan su administración.

Más recientemente, en 2001, se ha desarrollado una vacuna conjugada con proteínas que contiene material antigénico frente a los 7 serotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23 F) que con mayor frecuencia producen infección en los niños. El hecho de que esté conjugada es lo que la hace indicada en niños, dado que a estas edades el timo no ha madurado de forma suficiente y los polisacáridos de los serotipos de la bacteria son muy inestables. La vacuna induce la formación de anticuerpos específicos que se unen a los polisacáridos capsulares, produciéndose la fagocitosis y muerte del neumococo. Esta vacuna es la primera y única eficaz en menores de 2 años, grupo de edad donde se concentra la mayor morbilidad y mortalidad por infección neumocócica debido a la inmadurez de su sistema inmune.

En un estudio reciente se ha observado un descenso global de enfermedad neumocócica invasiva de 25,1 a 12,6 casos/100.000 habitantes/año, que fue mayor para cepas resistentes a penicilina y otros antibióticos, con un descenso global de la mortalidad del 35%<sup>49</sup>. Además, la vacuna reduce el estado de portador de la enfermedad y, por tanto, el riesgo de contagio a individuos sanos, niños o adultos.

## **1.7. SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA**

### **1.7.1. Aspectos generales y mecanismos de control**

La resistencia a los antibióticos se ha convertido en un auténtico problema de salud pública en el que intervienen varios factores, entre los que cabe destacar el uso incorrecto y la exposición prolongada a los antibióticos. Algunos estudios

han observado una correlación significativa entre el elevado consumo de antibióticos ( $\beta$ -lactámicos, fluoroquinolonas) y la aparición de resistencias en una determinada área geográfica<sup>50,51</sup>. En un estudio realizado en España sobre el uso de antibióticos entre 1987 y 1997, el consumo de cefalosporinas había aumentado un 363%, el de macrólidos un 190% y el de quinolonas un 70%<sup>52</sup>.

Hasta los años 70 el neumococo era universalmente sensible a la mayoría de antibióticos y muy especialmente a la penicilina. Desde entonces se ha observado un aumento progresivo de las tasas de resistencia a un gran número de antibióticos, siendo actualmente la vancomicina el único antimicrobiano en el que no se han descrito. Las primeras resistencias aparecieron en los años 60 a tetraciclina y eritromicina, seguidas por resistencia a cloranfenicol, cotrimoxazol, penicilina y, más recientemente, a cefalosporinas y nuevas quinolonas<sup>53,54</sup>.

En los niveles de resistencia del *S. pneumoniae* a agentes antibacterianos influyen factores como el serotipo, la edad de los pacientes y el tipo de muestra analizada. Parece existir una correlación entre la resistencia a la penicilina y algunos serotipos específicos de neumococo, seis serotipos (6, 9, 14, 19, 23) representan más del 80% de los aislamientos clínicos resistentes, mientras que los serotipos 3, 10, 11, raramente poseen genes de resistencia<sup>55</sup>. Por grupos de edad se ha observado resistencia mucho más elevada en niños que en adultos<sup>6,56</sup> y los serotipos más frecuentes asociados a enfermedad invasiva en nuestro país son el 14, 6, 1 y 19.

Respecto a la muestra clínica de dónde proceden, las cepas de aislamientos de sangre o de LCR presentan niveles de resistencia más bajos que las originarias del tracto respiratorio superior<sup>4</sup>. Este hecho está en relación con el predominio de cepas resistentes entre los serotipos menos invasivos; hallazgos recientes sugieren que el desarrollo de resistencia se acompaña de una disminución de la invasividad<sup>57,58</sup>. Algunos estudios han demostrado que el hecho de tener una infección por cepas resistentes a penicilina no se asocia por si misma a un aumento de la mortalidad por enfermedad neumocócica invasiva<sup>59</sup>.

Por otro lado, se aprecian diferencias muy acusadas entre los niveles de resistencia a penicilina y otros antimicrobianos según los países e incluso en un mismo país, de una región a otra. España tiene un alto nivel de resistencia a la penicilina, con unas cifras que oscilan entre el 30-50%, siendo una de las más altas de Europa, si bien es cierto que en los últimos años se ha estabilizado. Además, la resistencia a penicilina suele asociarse a una disminución de la sensibilidad a otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos, de los cuales ceftriaxona, cefotaxima y carbapenémicos son los que menos se ven afectados y, por tanto, generalmente son más activos frente al neumococo<sup>60</sup>.

La resistencia de *S. pneumoniae* a macrólidos ha aumentando progresivamente en los últimos años en todo el mundo, y es más frecuente entre cepas resistentes a penicilina que entre cepas sensibles a este antibiótico<sup>61</sup>, esto parece deberse más a motivos ambientales de presión antibiótica que a causas genéticas, puesto que los genes que codifican ambos tipos de resistencia no están relacionados. En un estudio internacional realizado por el Proyecto Alexander en Europa, se observó una prevalencia media de cepas resistentes a macrólidos del 17%, con unos límites que van del 7% en Alemania al 35% en España<sup>62</sup>.

En general la resistencia a fluoroquinolonas es baja, aunque ya ha comenzado a aumentar en el caso de ciprofloxacino y levofloxacino, como consecuencia de la utilización masiva de estos antibióticos en los últimos años<sup>63,64</sup>. Por ejemplo, en un estudio realizado en España se produjo un aumento desde cifras de 0,9% de cepas resistentes a ciprofloxacino en 1991-92 al 3% en 1997-98<sup>65</sup>. Además, hay que tener presente que algunas de estas cepas también son resistentes a  $\beta$ -lactámicos, macrólidos y otros antibióticos. La actividad de las nuevas quinolonas frente al neumococo es superior a las anteriores y tienen unas CMI's más bajas; entre ellas destacan gemifloxacino, moxifloxacino y gatifloxacino, aunque algunas se han retirado del mercado debido a su toxicidad.

Por último, no hay que olvidar que muchas veces se produce resistencia a diferentes familias de antibióticos, lo que complica notablemente el tratamiento

de algunas enfermedades neumocócicas. En un estudio realizado en 1.817 muestras de pacientes con infección del tracto respiratorio adquirida en la comunidad, el 22% de las mismas eran multiresistentes<sup>7</sup>.

Tal como se ha comentado la resistencia a antimicrobianos en algunos de los patógenos bacterianos más prevalentes, como el *S. pneumoniae*, es un importante problema clínico, epidemiológico y de salud pública reconocido en todo el mundo que se está agudizando en los últimos años. En un mundo globalizado como el actual, tanto el movimiento de personas como de alimentos de origen animal facilita la diseminación de resistencias. La vigilancia epidemiológica es necesaria para su control, ya que el conocimiento de la situación de la resistencia a antibióticos y sus tendencias evolutivas, mediante el establecimiento de estudios multicéntricos y de sistemas de vigilancia, nos permitirá tomar decisiones que ayuden a su contención, así como la elaboración de protocolos de tratamiento empírico<sup>66</sup>.

Con objeto de establecer un control de los niveles de resistencia antibiótica en los diferentes países disponemos de programas epidemiológicos que se dedican a monitorizar la sensibilidad de algunas especies bacterianas a diversos antibióticos: el Proyecto Alexander que estudia los patógenos del tracto respiratorio inferior en todo el mundo; la Red Europea para el Control de la Resistencia a Antimicrobianos en Patógenos Invasivos, EARSS o en los Estados Unidos, dentro del CDC, el centro Activo de Epidemiología Bacteriana que se ocupa de la vigilancia antibacteriana. En España, la Red Española para la Vigilancia y el Estudio de la Resistencia a Antibióticos (REVERA), centralizada y coordinada desde el Centro Nacional de Microbiología de Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Sanidad y Consumo), actúa como sub-red española de EARSS suministrando datos con una periodicidad cuatrimestral a la central europea. REVERA-EARSS ha analizado información de más de 28.000 muestras españolas de sangre y LCR entre 2000 y 2005.

Por otro lado, también se recomienda mantener una política restrictiva en el consumo de antibióticos, racionalizando su uso, para disminuir la aparición de resistencias. Es necesaria la colaboración de todos los agentes implicados,

principalmente los prescriptores, los farmacéuticos, la administración sanitaria y la industria farmacéutica para hacer frente a tan importante problema mundial.

Debido a la alta prevalencia de resistencia antibiótica a *S. pneumoniae* se realizan de forma rutinaria estudios de sensibilidad antibiótica en todas las muestras para penicilina, cefotaxima/ceftriaxona, eritromicina y ciprofloxacino. El CLSI publica periódicamente las directrices metodológicas que deben seguirse para realizar estos estudios.

### **1.7.2. Tipos de resistencia a los antibióticos**

La adquisición de resistencia a los antibióticos puede deberse a cambios en el ADN cromosómico, por mutación de algún gen propio de la bacteria, o por la adquisición de material genético extracromosómico mediante transferencia genética. Algunos ejemplos de resistencias mutacionales son las fluoroquinolonas, por mutación en los genes *gyrA* y *parC* y la topoisomerasa IV<sup>67</sup>, o mutaciones en el gen *ropB* y resistencia a rifampicina<sup>68</sup>.

La transferencia de material genético entre bacterias puede tener lugar a través de tres procesos: transformación, transducción y conjugación<sup>69</sup>. Con la transformación, la bacteria adquiere el ADN directamente del medio ambiente, a partir de otra bacteria que ha liberado su material genético. Este nuevo material genético se integra en el ADN cromosómico de la bacteria receptora mediante un proceso de recombinación homologa. Este proceso puede dar lugar a la estructura genética en mosaico; en *S. pneumoniae*, los genes que codifican las PBPs alteradas son genes en mosaico y la resistencia a la penicilina y cefalosporinas es un claro ejemplo de esta forma de transferencia genética.

La conjugación plasmídica es el mecanismo más frecuente para intercambiar material genético mediante el cual adquieren una gran cantidad de genes. La adquisición de material genético por acción de un bacteriófago (virus) se conoce como transducción y permite a la bacteria adquirir una cantidad relativamente pequeña de ADN.

El ejemplo más característico de aparición de resistencia a los antibióticos por mutaciones en genes adquiridos son las  $\beta$ -lactamasas de espectro ampliado. Son codificadas por genes de localización plasmídica y aparecen al producirse mutaciones puntuales en el gen que codifica la  $\beta$ -lactamasa. No obstante, no se han comunicado neumococos productores de  $\beta$ -lactamasas.

Los mecanismos básicos por los cuales una bacteria puede expresar resistencia a un antibiótico son: modificación de la diana sobre la que actúa el antibiótico; modificación, alteración o desactivación del antibiótico y disminución de la cantidad de antibiótico que puede acceder a la diana, bien porque hay una disminución de la permeabilidad que impide la entrada del antibiótico al interior de la bacteria o porque hay un aumento de la eliminación del antibiótico por un sistema de expulsión activa<sup>70</sup>.

### **1.7.3. Resistencia a la penicilina**

Para estudiar la sensibilidad de *S. pneumoniae* a la penicilina se utiliza la difusión en agar por la técnica de disco-placa. Para conocer la resistencia a penicilina se debe usar un disco de oxacilina de 1  $\mu\text{g}$ ; si el diámetro del halo de inhibición es mayor de 20 mm la cepa se considera sensible, pero si es menor no se puede distinguir entre cepas con resistencia moderada o alta. Este método es sencillo y puede ser apropiado en zonas con bajos niveles de resistencia, pero tiene el inconveniente de que no determina la CMI. Para poder especificar el nivel de resistencia hay que determinar la CMI mediante un método cuantitativo como la microdilución en caldo, que es más laborioso y no resulta práctico para el trabajo diario. Actualmente existe una alternativa sencilla y rápida como es el método de difusión en agar con tiras de E-test<sup>71</sup>. La correlación entre ambas técnicas es buena, aunque la CMI obtenida suele estar una o dos diluciones por debajo del valor obtenido con la microdilución. La cepa se considera sensible a la penicilina cuando la CMI es  $\leq 0,06 \mu\text{g/ml}$ , con resistencia moderada o intermedia cuando la CMI está entre  $0,1-1 \mu\text{g/ml}$  y resistente cuando la CMI es  $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ .

### *Mecanismo de resistencia*

La resistencia a penicilina se debe a alteraciones en la estructura o tamaño de las PBPs que se encuentran en la membrana celular bacteriana, lo que provoca una disminución de la afinidad de estas proteínas por la penicilina. En los gérmenes sensibles a la penicilina la inactivación de las PBPs de alto peso molecular provoca la muerte de la bacteria al impedir la producción de peptidoglicano por parte de pared bacteriana. La alteración en dichas proteínas provoca una modificación de la diana sobre la que actúa la penicilina y otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos, lo que se traduce en una menor sensibilidad del neumococo al antibiótico que requiere concentraciones más altas para saturar las PBPs<sup>72</sup>.

En el *S. pneumoniae* se han descrito cinco PBPs de elevado peso molecular (1a, 1b, 2a, 2b, 2x) y una proteína fijadora de penicilina (PBP 3) de bajo peso molecular. Las alteraciones en las PBPs suelen ser debidas a alteraciones genéticas, como consecuencia de intercambio genético por fenómenos de transformación con la adquisición de ADN externo, procedente de otros neumococos o de otras especies relacionadas de estreptococos (*S. mitis* o *S. sanguis*)<sup>73,74</sup>. Parece necesario que se produzcan varias transformaciones con ADN de diferentes especies para que se origine un gen con estructura en mosaico que de lugar a una PBP con baja afinidad a la penicilina.

Algunos neumococos con PBP alteradas presentan tolerancia a la penicilina. Esta tolerancia parece generarse por alteraciones genéticas a nivel de la regulación de la actividad autolítica<sup>75</sup>.

Según el tipo de alteración genética en alguna de las distintas PBPs podemos encontrar diversos grados de resistencia a la penicilina. Alteraciones de la PBP 1a y 2x suele ser responsable de resistencia intermedia, mientras que la adquisición de un grado elevado de resistencia a la penicilina suele requerir adicionalmente genes mosaico en la *pbp 2a* y *2b*<sup>76,77</sup>.

### *Epidemiología*

Los primeros casos de neumococo con sensibilidad disminuida a la penicilina fueron descritos en Australia por Hansman<sup>78</sup>, a finales de la década de los sesenta del siglo pasado, aunque fue en 1978 en Sudáfrica donde se describió la primera epidemia causada por neumococos con resistencia elevada a penicilina en pacientes afectados de enfermedad neumocócica invasiva grave como meningitis, bacteriemia o neumonía, que se asoció a fracasos terapéuticos y a una alta mortalidad<sup>3</sup>. Desde entonces, la resistencia del neumococo a la penicilina se ha ido extendiendo a todo el mundo<sup>79</sup>.

En la diseminación de la resistencia es importante la transferencia horizontal de los genes mosaicos *pbp* y la propagación a otras zonas geográficas por las cepas que portan dicho gen. Las PBP alteradas que tienen distribuciones regionales concretas sugieren un origen clonal independiente, aunque posteriormente puedan haberse extendido de unas zonas a otras. Un caso como estos sería el clon Spain<sup>23F</sup>-1, resistente a penicilina, cloranfenicol, cotrimoxazol y tetraciclina, descrito por primera vez en España en los años 80 y que a partir de 1991 se aisló en los Estados Unidos, Sudáfrica y otros países europeos<sup>80,81</sup>. La rápida extensión de algunos de estos clones ha sugerido que estas cepas puedan ser portadoras de algún factor que le proporcione mayor virulencia o mayor capacidad de colonización<sup>82</sup>.

España es uno de los países de Europa que presenta una incidencia de resistencia a la penicilina más elevada. La prevalencia aumentó desde un 8% en 1979 hasta cifras cercanas al 50% en los años 80<sup>83</sup> y desde la década de los 90 hasta la actualidad, aunque hay una tendencia a la estabilización, persiste una resistencia elevada del orden del 35-40%<sup>8,84</sup>. No obstante, hay que destacar que la mayoría de aislamientos con sensibilidad disminuida a penicilina presentan una sensibilidad intermedia con CMI<sub>s</sub> entre 0,1-1 µg/ml, con poca repercusión en clínica respiratoria ya que es posible el tratamiento de infecciones extrameningeas con dosis más elevadas de las habituales de estos antibióticos. Aunque solo un porcentaje inferior al 10% de las cepas tienen una alta resistencia a la penicilina (CMI<sub>s</sub> < 2 µg/ml)<sup>8</sup>, este hecho puede complicar

notablemente el tratamiento y hace aconsejable buscar alternativas terapéuticas.

#### 1.7.4. Resistencia a cefalosporinas de tercera generación

Los métodos de difusión por la técnica disco-placa no han dado buenos resultados para establecer la sensibilidad del neumococo a las cefalosporinas de tercera generación (C3G). Por ello se recomienda determinar la CMI por microdilución o, de forma más rápida, por difusión en agar con tiras de E-test.

En el año 2002, el CLSI cambió los criterios de los puntos de corte para detectar la resistencia a ceftriaxona y cefotaxima en aislamientos de *S. pneumoniae*, estableciendo diferencias según el tipo de muestra (tabla 1-1). En las muestras de aislamientos de enfermedades no meníngeas en las que las C3G son muy eficaces, los puntos de corte son más elevados. Por el contrario, en aislamientos de LCR, basándose en los fracasos terapéuticos observados con CMI  $\geq 1$   $\mu\text{g/ml}$  a C3G, los criterios son más exigentes<sup>85</sup>.

<i>S. pneumoniae</i>	CEFOTAXIMA CEFTRIAXONA		
	Sensible	Resistencia intermedia	Resistente
CMI. Muestra no meníngea	$\leq 1$ $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$	$\geq 4$ $\mu\text{g/ml}$
CMI. Muestra LCR	$\leq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	$\geq 2$ $\mu\text{g/ml}$

**Tabla 1-1.** Puntos de corte de susceptibilidad a C3G en aislamientos de *S. pneumoniae*

#### *Mecanismo de resistencia*

La resistencia a cefalosporinas de tercera generación está determinada también por alteraciones en la PBPs como en la penicilina, y en este caso a nivel de dos PBPs: la 1a y la 2x<sup>86</sup> que disminuyen su afinidad para unirse al antibiótico. Cuando solo se alteran estas PBPs y el resto son normales, los neumococos son resistentes a las C3G pero conservan la sensibilidad a la penicilina. Una única sustitución en el gen *pbp 2x* es responsable de niveles de

resistencia elevados a las C3G con CMI de hasta 16-32  $\mu\text{g/ml}$ <sup>87</sup>. Por el contrario, cambios en la PBP 2b que ocasiona niveles de resistencia a la penicilina no contribuyen a la adquisición de resistencia a C3G, ya que las cefalosporinas no presentan afinidad por esta proteína. Aunque, tal como ya se ha comentado, la resistencia a la penicilina se acompaña de niveles de resistencia cruzada a otros  $\beta$ -lactámicos y concretamente a las cefalosporinas de tercera generación. No obstante, la ceftriaxona o cefotaxima suelen presentar una CMI aproximadamente la mitad que la penicilina.

### *Epidemiología*

La aparición en España de cepas de *S. pneumoniae* con sensibilidad disminuida a C3G se remontan a finales de los años 80, cuando su prevalencia en aislamientos invasivos era aproximadamente de un 20%<sup>60</sup>. Desde entonces se han descrito fracasos terapéuticos en algunas enfermedades neumocócicas graves tratadas con C3G, provocadas por cepas con una CMI  $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ <sup>9,88,89</sup>.

En un estudio epidemiológico realizado en el Hospital de Bellvitge con cepas invasivas de *S. pneumoniae* se observó que en 1989 no había ninguna cepa con CMI = 2  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que en 1996 el 15% de los aislamientos tenían una CMI  $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ <sup>90</sup>. Aunque en los últimos años siguen apareciendo casos esporádicos de difícil tratamiento con cepas que presentan CMI  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ , la prevalencia de resistencia a C3G va descendiendo tanto en España como en otros países<sup>7,91</sup>. En un estudio realizado en España entre los años 2001-2003, en 1.869 muestras de cepas invasivas, el 9,7 mostraba disminución de la susceptibilidad a cefotaxima, pero solo el 1,4% tenía una CMI  $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ <sup>8</sup>.

#### **1.7.5. Multiresistencia**

La mayor parte de las cepas de neumococo resistentes a penicilina y C3G presentan resistencia cruzada con el resto de  $\beta$ -lactámicos y con otros grupos de antibióticos. Fenoll encontró que hasta el 72% de las cepas resistentes a penicilina eran también resistentes a otros antibióticos, mientras que solo lo eran el 21% de las cepas sensibles<sup>4</sup>.

El aumento de la prevalencia de la multiresistencia de *S. pneumoniae* es un problema importante que puede complicar el tratamiento de algunas infecciones neumocócicas. En Estados Unidos, entre 1995 y 1998, la proporción de aislamientos que eran resistentes a 3 o más clases de antibiótico aumentaron del 9% al 14%<sup>92</sup>, observándose en algunos estudios recientes valores de multiresistencia del orden del 20% o superiores<sup>7,93</sup>.

En la tabla 1-2 se pueden apreciar algunas frecuencias de resistencia antibiótica obtenidas de aislamientos invasivos de *S. pneumoniae* en España.

Antibióticos	Valores CMI*	Resistencia	Referencia
Amoxicilina	> 4 µg/ml	6,5 - 9,5 %	6,63,91
Clindamicina	> 0,25 µg/ml	21 - 39 %	8,91
Cloramfenicol	> 4 µg/ml	13 - 26 %	6,91
Eritromicina	> 0,25 µg/ml	26 - 35 %	6,8,63
Ciprofloxacina	> 2 µg/ml	1,5 - 7 %	6,8,63
Levofloxacina	> 2 µg/ml	0,6 - 1 %	6,8,91
Rifampicina	> 1 µg/ml	0,7 - 1,1 %	8,68
Tetraciclina	> 2 µg/ml	22 - 47 %	6,8,91
Vancomicina	> 1 µg/ml	0 %	8,63

\* Puntos de corte según el CLSI

**Tabla 1-2.** Frecuencia de resistencia en aislamientos invasivos de *S. pneumoniae* en España (años 1998-2003)

## 2. Meningitis neumocócica

### 2.1. EPIDEMIOLOGÍA

La meningitis bacteriana es una enfermedad grave que amenaza la vida y que condiciona una elevada morbilidad. Tiene una incidencia anual estimada de 1-6 casos por cada 100.000 habitantes<sup>94,95</sup>, aunque puede ser muy superior en países poco desarrollados; además su incidencia varía notablemente según la edad, siendo más elevada en los niños menores de dos años y en las personas mayores.

Las estrategias de vacunación durante las últimas dos décadas han cambiado sustancialmente la epidemiología de la meningitis bacteriana. La vacunación sistemática en niños frente a *Haemophilus influenzae* tipo B, prácticamente ha erradicado la meningitis por esta bacteria en los países industrializados<sup>96,97</sup>. Actualmente *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis* son responsables del 80% de las meningitis bacterianas agudas, y la meningitis bacteriana se está observando más en personas adultas. Exceptuando el periodo neonatal, *S. pneumoniae* constituye la causa más frecuente de meningitis adquirida en la comunidad en nuestro medio.

La prevalencia de meningitis neumocócica en España es elevada, especialmente en niños menores de 2 años, y es similar a la encontrada en otros países europeos. En un estudio realizado en 5 comunidades autónomas (Cataluña, Galicia, Madrid, Navarra y País Vasco) en niños entre 0 y 14 años, la incidencia de meningitis fue de 6,5 casos cada 100.000 niños, aunque en los menores de 2 años era de 13,3 y llegaba al 17,7 en los menores de 1 año, observándose variaciones según las regiones<sup>98,99</sup>. En algunos estudios europeos las cifras oscilan entre 5,6 y 7,2 cada 100.000 niños<sup>100,101</sup>, y en Estados Unidos 7,5 cada 100.000 niños, en menores de 2 años<sup>102</sup>.

En la población adulta la incidencia de meningitis es menor y existen menos estudios. En un trabajo realizado por Domínguez y col. en España, la incidencia en mayores de 65 años era de 1,7 casos cada 100.000 habitantes<sup>103</sup>. Las cifras son similares a las de un estudio en Gales e Inglaterra, con valores que oscilan

entre 0,85 y 1,2 casos<sup>104</sup>, o en Estados Unidos con 1,0 caso cada 100.000 personas<sup>102</sup>.

### 2.1.2. Pronóstico y complicaciones

A pesar de los avances en el tratamiento antibiótico, la meningitis causada por *S. pneumoniae* sigue siendo una causa importante de morbi-mortalidad. La mortalidad global de la meningitis neumocócica en adultos oscila entre el 20-30%, siendo más elevada en las personas mayores de 60 años<sup>2</sup>; este peor pronóstico probablemente se deba a la mayor presencia de enfermedades subyacentes a estas edades. En los niños la mortalidad es algo menor (7-20%), pero importante, y el índice de secuelas es alto. En los países en vías de desarrollo la mortalidad es mucho más elevada superando el 50%, debido al retraso que se produce en el diagnóstico e inicio del tratamiento adecuado<sup>105</sup>.

Las complicaciones de la meningitis bacteriana pueden dividirse en sistémicas y neurológicas. Las complicaciones intracraneales que aparecen durante la fase aguda de la enfermedad constituyen la principal causa de mortalidad y de secuelas en la meningitis bacteriana. En los adultos estas complicaciones pueden variar entre el 64-75% de los pacientes, siendo las más frecuentes las convulsiones, el edema e infarto cerebral, la hidrocefalia y la parálisis de pares craneales. Las complicaciones sistémicas, que desarrollan hasta el 38-45% de los pacientes, son consecuencia de la bacteriemia que acompaña frecuentemente a la meningitis y entre ellas destaca el shock séptico, el fallo cardiorrespiratorio o la coagulación intravascular diseminada<sup>106</sup>. La muerte en las personas mayores de 60 años suele asociarse a complicaciones sistémicas, mientras que en los adultos más jóvenes predominan las complicaciones neurológicas como causa de muerte<sup>107</sup>.

Se han realizado diversos estudios para determinar que factores se asocian con una mayor mortalidad. Weisfelt y col. detectan que una baja puntuación en la escala de Glasgow y parálisis de los pares craneales al ingreso, menos de 1000 leucocitos/mm<sup>3</sup> en LCR y una alta concentración de proteínas en LCR eran factores independientes predictores de mal pronóstico<sup>2</sup>. En el estudio de Aurburtin y col. se asoció a una mayor mortalidad la necesidad de ventilación

mecánica, la trombopenia y la alcalosis<sup>108</sup>. En otro estudio realizado en niños por Casado y col. encontró una fuerte asociación entre muerte y la presencia en el diagnóstico de shock, alteraciones pupilares y baja concentración en LCR de proteínas y leucocitos. Aunque las convulsiones fueron más frecuentes en los niños menores de 1 año que en los más mayores, esto no se asoció con la mortalidad<sup>109</sup>.

Además de la elevada mortalidad de esta enfermedad, el 30% o más de las personas que sobreviven presentan algún tipo de secuelas neurológicas en forma de sordera, parálisis de los pares craneales, déficits cerebrales focales (afasia, ataxia o hemiparesias) o algún grado de deterioro neuropsicológico<sup>2,109</sup>.

En la mayoría de los casos esta grave evolución de la meningitis no es debida a fracasos del tratamiento antibiótico, sino a la gravedad de las complicaciones sistémicas y neurológicas que precozmente ocurren en la enfermedad. Por este motivo, es muy importante administrar un tratamiento adyuvante precoz que module la grave respuesta inflamatoria que se genera en la meningitis y que juega un papel clave en la mortalidad y en el daño cerebral que provoca esta enfermedad<sup>2</sup>.

## **2.2. PATOGENIA Y FISIOPATOLOGÍA**

Hasta el 20% de los casos de meningitis neumocócicas se presentan como una infección primaria, sin foco aparente. El resto de episodios son secundarios a infecciones neumocócicas en otras localizaciones: otitis media aguda (30%), sinusitis (5%), neumonía (20%), o fístulas pericraneales después de traumatismos craneoencefálicos o de cirugía (30%). La existencia de fístulas de LCR puede dar lugar a episodios recurrentes de meningitis, en tanto persista la comunicación fistulosa.

La meningitis puede producirse por dos mecanismos patogénicos. En primer lugar, puede hacerlo por extensión directa de la infección desde los senos paranasales o el oído medio, por vía venosa retrógrada, o bien por contigüidad en traumatismos o fístulas pericraneales. El segundo mecanismo por el que las

bacterias llegan al SNC es por diseminación hematógica a los plexos coroideos, en el curso de una bacteriemia por *S. pneumoniae*<sup>110</sup>. Esta forma explica la frecuente asociación entre meningitis y neumonía neumocócica.

Para que la meningitis se desarrolle se deben superar varias etapas que se suceden de forma secuencial: invasión del espacio subaracnoideo con infección de las meninges; multiplicación bacteriana e inducción de inflamación; progresión de la inflamación como mecanismo de respuesta del huésped y desarrollo de lesiones neuronales. Una vez que el microorganismo logra entrar en el LCR, se inicia una rápida multiplicación del mismo de carácter exponencial. Las bacterias o ciertos componentes de la pared celular inducen la liberación de citoquinas, que marcan el inicio de la cascada inflamatoria meníngea, ocasionan aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y aflujo de leucocitos y elementos humorales (figura 1-1); como consecuencia de estos fenómenos se produce edema cerebral, aumento de la presión intracraneal y lesión neuronal. A continuación se describen las interacciones que se producen entre el neumococo y el huésped, que constituyen la patogenia de la meningitis de origen hematógico<sup>111-113</sup>.

### **Adherencia y colonización de la nasofaringe**

El primer paso para el desarrollo de la meningitis bacteriana es la adherencia y colonización de la nasofaringe por el microorganismo. Algunos componentes de la superficie del neumococo como los polisacáridos de la cápsula o ciertas proteínas son importantes para la adherencia al epitelio de la nasofaringe y para inactivar las defensas del huésped (inmunoglobulinas IgA1) en el aparato respiratorio superior, favoreciendo la penetración en la mucosa. La entrada del neumococo al epitelio de la mucosa y a la membrana basal, y la invasión de los pequeños vasos sanguíneos subepiteliales constituyen un aspecto crucial en las primeras etapas de la patogenia de la meningitis.

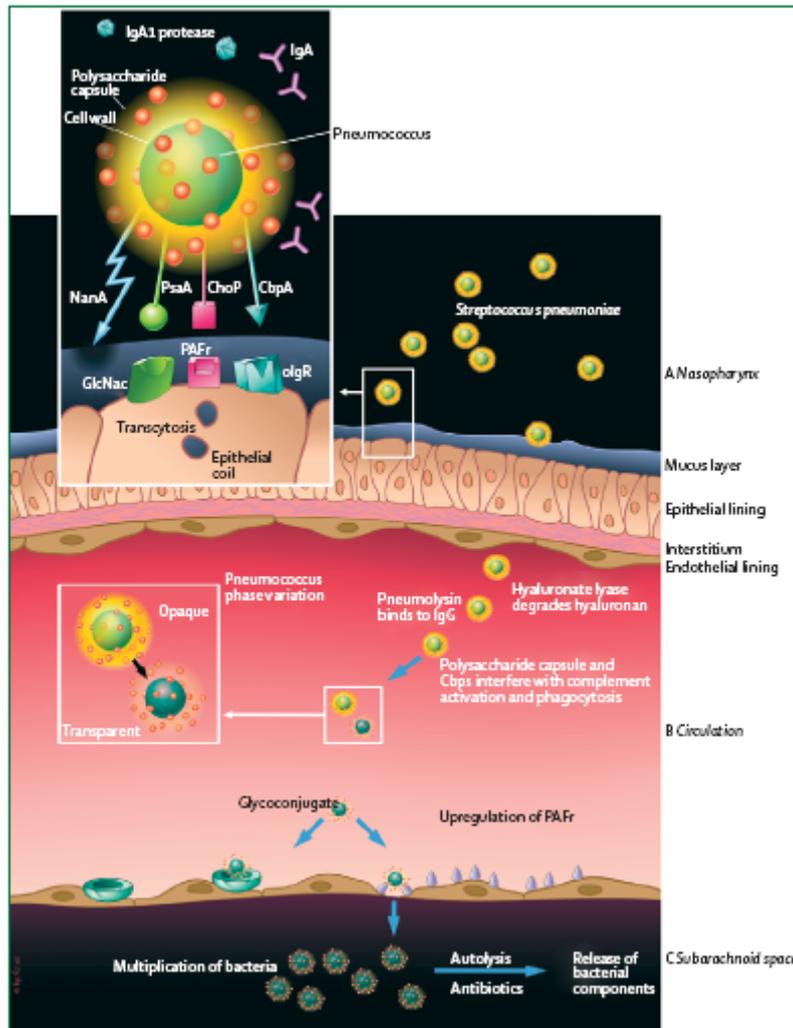


Figura 1-1. Patogenia de la meningitis

### Supervivencia y diseminación hematogena

Una vez que el neumococo ha atravesado la mucosa y llega a la sangre, si consigue superar las defensas del huésped, puede sobrevivir y multiplicarse. La cápsula polisacárida es el principal factor de virulencia que permite al neumococo sobrevivir en el torrente circulatorio al impedir la fagocitosis y la activación de la vía alternativa del complemento, que facilita la opsonización y su depuración intravascular. Este hecho representa una parte esencial de las defensas del huésped frente a este patógeno, de tal forma que los pacientes que presentan deficiencias en los componentes terminales de la vía del complemento o bien las personas esplenectomizadas presentan mayor predisposición a padecer meningitis neumocócica. La neumolisina, toxina que

se libera cuando se produce la lisis bacteriana, parece que juega un papel importante en la supervivencia de la bacteria en la sangre; la neumolisina además de sus propiedades citotóxicas, en ausencia de anticuerpos específicos es capaz de activar la vía clásica del complemento, con la consecuente reducción en el suero de la opsonización. En el huésped inmune, los macrófagos y los leucocitos polimorfonucleares, en presencia del complemento y de anticuerpos específicos, fagocitan al neumococo y controlan el avance de la infección. Si estos mecanismos son ineficaces, la bacteriemia permite la llegada del neumococo a zonas habitualmente estériles como el espacio subaracnoideo.

### **Penetración del neumococo en el SNC**

Tras llegar al SNC, los gérmenes deben atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) para acceder al espacio subaracnoideo. Aunque la zona exacta por donde lo hace no es bien conocida, parece ser que el neumococo penetraría gracias a una proteína de su superficie (CbpA) que, tras actuar sobre unos receptores (los mismos del factor activador plaquetario [FAP]) de las células endoteliales de los plexos coroideos y/o capilares cerebrales, le permitiría la entrada en la célula contenido en una vacuola<sup>114</sup>. La penetración de los gérmenes podría verse también favorecida por el elevado flujo sanguíneo (200 ml/g/min) que existe en los plexos coroideos.

### **Supervivencia y multiplicación en el espacio subaracnoideo**

Una vez que los neumococos alcanzan el espacio subaracnoideo, los mecanismos defensivos del huésped se muestran ineficaces para detener la infección. Los mecanismos de defensa en el LCR están muy limitados, ya que las bajas concentraciones de inmunoglobulinas y complemento son insuficientes para opsonizar y fagocitar a patógenos encapsulados como el *S. pneumoniae*. En esta situación, las bacterias se multiplican en el espacio subaracnoideo de forma logarítmica durante las primeras 24 horas, pudiendo alcanzar concentraciones de  $10^7$  ufc/ml. Parte de estas bacterias pueden volver por los senos venosos a la circulación sistémica provocando una bacteriemia secundaria a partir del foco de la meningitis.

### **Inducción de inflamación**

La importante multiplicación bacteriana que tiene lugar y la posterior autólisis del neumococo provoca la liberación de componentes bacterianos con un gran potencial inflamatorio (peptidoglicano, ácido teitoico, neumolisina y ADN bacteriano) en el LCR. La presencia de estos productos bacterianos en el espacio subaracnoideo activa la vía alternativa del complemento e inicia la cascada inflamatoria con la síntesis y liberación de gran cantidad de mediadores de la inflamación en el LCR, como citocinas: factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucinas (IL-1 $\beta$  y IL-6), prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>), quimiocinas (IL-8) o FAP. Como consecuencia de esta inflamación se produce una entrada masiva de leucocitos polimorfonucleares en el LCR, pero la eficacia fagocitaria no es muy importante porque no se ha producido previamente la opsonización.

La entrada de neutrófilos en el LCR es un hecho crucial en la meningitis bacteriana y es uno de los principales responsables de los efectos secundarios de la enfermedad. La activación de los granulocitos y de otras células del SNC, como las células endoteliales o los astrositos, pueden generar sustancias citotóxicas (intermediarios de oxígeno activo, óxido nítrico, proteasas como las metal-proteinasas de la matriz) que contribuyen a la lesión cerebral que se asocia a la meningitis<sup>115-117</sup>.

En estudios de meningitis neumocócica en el conejo se ha observado que el tratamiento antibiótico, especialmente con betalactámicos, provoca una importante destrucción celular con liberación de componentes bacterianos de la pared celular capaces de desencadenar la respuesta inflamatoria, agravando así la inflamación en el LCR, lo que afecta negativamente en el desarrollo clínico de la enfermedad<sup>118</sup>. Este hecho explicaría, en parte, la incidencia de muertes a pesar de la curación bacteriológica de los pacientes.

### **Desarrollo de la lesión neuronal**

La lesión en el parénquima cerebral es la consecuencia más importante y la responsable de las secuelas de la meningitis bacteriana. La lesión del parénquima puede evidenciarse por la presencia de edema cerebral, signos de

herniación, aumento de la presión intracraneal, áreas de isquemia e infarto cerebral y cambios histológicos, que incluyen necrosis de neuronas corticales y muerte de células neuronales del hipocampo por apoptosis. Estos cambios histológicos se han podido observar en pacientes que han fallecido por meningitis aguda y en diversos modelos animales de meningitis<sup>119,120</sup>. En la figura 1-2 se describe la cascada fisiopatológica que conduce a la lesión neuronal durante la meningitis.

#### *Alteración de la barrera hematoencefálica*

La meningitis bacteriana provoca un aumento de la permeabilidad de la BHE frente a diversas sustancias, como proteínas, iones o los mismos antibióticos. Este aumento de la permeabilidad se produce como consecuencia de una alteración a nivel del epitelio de los plexos coroideos y del endotelio microvascular, esto conduce a la separación de las finas uniones intercelulares del epitelio vascular y a un aumento de la formación de vesículas pinocíticas<sup>121</sup>. Los cambios en la permeabilidad favorecen la entrada de componentes plasmáticos, neutrófilos y proteínas que se manifiestan en forma de edema vasogénico, pleocitosis y proteinorraquia. En el caso de los antibióticos, este hecho favorece el tratamiento ya que con las meninges inflamadas los niveles de antibiótico en el espacio subaracnoideo son bastante superiores a los alcanzados sin inflamación.

#### *Aumento de la presión intracraneal*

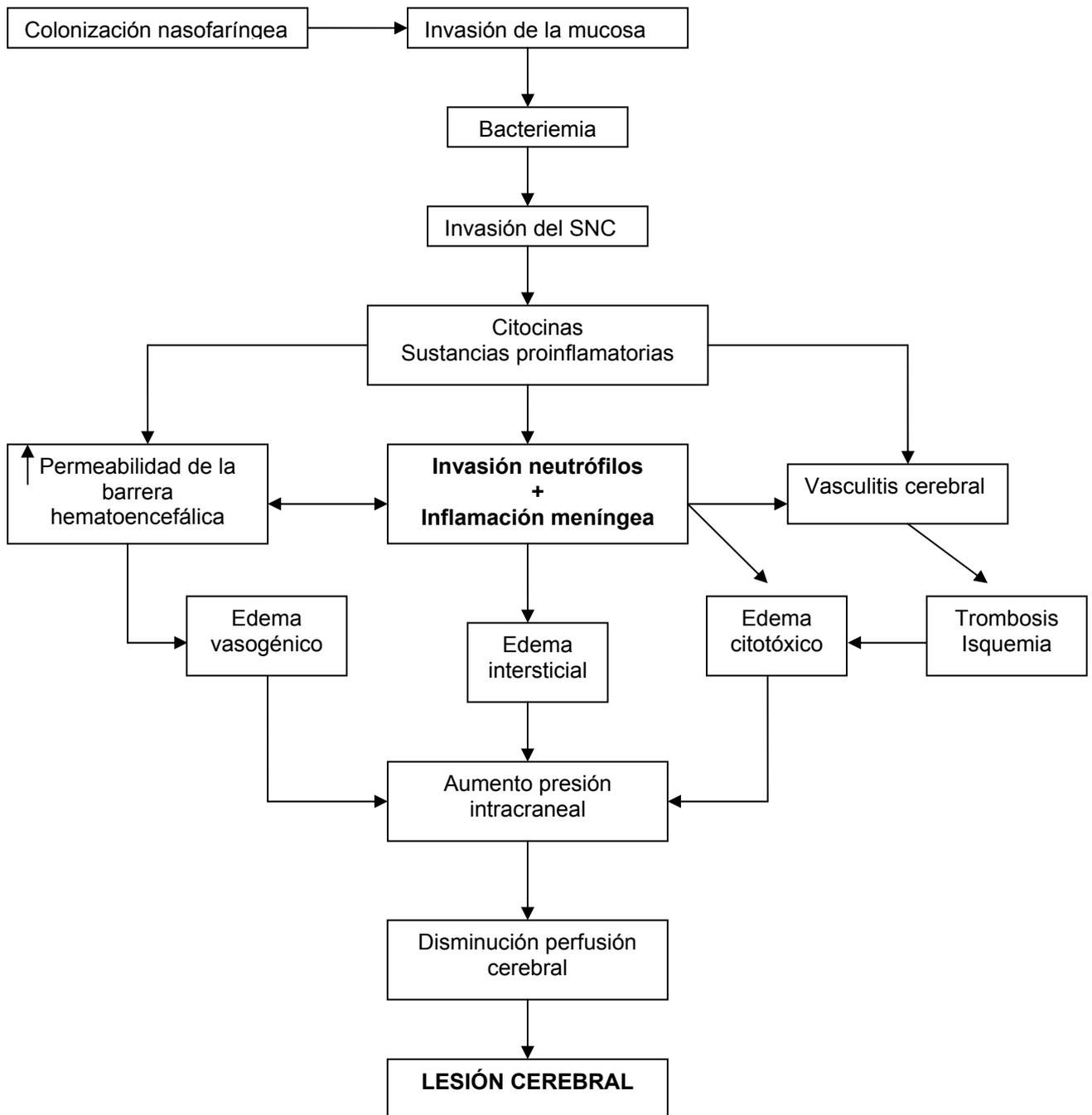
El principal elemento responsable de la aparición de hipertensión intracraneal en la meningitis bacteriana es el edema cerebral, que puede ser de origen vasogénico, citotóxico o intersticial<sup>122</sup>. El edema vasogénico es consecuencia del aumento de permeabilidad de la BHE. El edema citotóxico se debe a la liberación de productos tóxicos por parte de los neutrófilos y las propias bacterias. La secreción de la hormona antidiurética también contribuye al edema, ya que produce hipotonicidad del líquido extracelular lo que aumenta la permeabilidad del cerebro al agua. Por último, el edema intersticial se produce por un aumento de la resistencia al flujo normal del LCR con obstrucción a la salida del LCR, lo que puede conducir a la aparición de hidrocefalia.

*Alteraciones en el flujo sanguíneo cerebral*

La meningitis bacteriana se asocia a importantes cambios en el flujo sanguíneo cerebral. En las primeras fases de la enfermedad el aumento de volumen de sangre en el cerebro provoca vasculitis, estenosis y formación de trombos intravasculares, con la consecuente isquemia cerebral. La reducción del flujo cerebral se ha relacionado con un aumento de la producción de lactato en el LCR, un aumento de la utilización de glucosa y una disminución de la presión arterial, todo ello favorece la hipoxia cerebral.

Además, parece que los mediadores liberados en el proceso inflamatorio que acompaña a la meningitis producen una pérdida de la autorregulación de la circulación cerebral, de forma que ésta pasa a depender exclusivamente de la presión arterial sistémica<sup>123</sup>. De ahí la importancia de mantener a estos pacientes en una situación hemodinámica estable, para evitar las complicaciones de la enfermedad.

Tal como hemos visto en este apartado de la patogenia de la meningitis, las lesiones cerebrales asociadas a la enfermedad no dependen solamente de la presencia de las bacterias sino que la mayoría ocurren como consecuencia de la reacción inflamatoria del huésped a los componentes bacterianos. Será necesario realizar nuevos estudios que profundicen en la identificación de los mediadores moleculares responsables de las lesiones por necrosis y apoptosis celular. La mejor comprensión de los mecanismos moleculares de la lesión en la meningitis nos ayudará a desarrollar nuevas terapias adyuvantes dirigidas a atenuar la respuesta inflamatoria aguda, lo que contribuirá probablemente a mejorar el pronóstico de esta grave enfermedad.



**Figura 1-2.** Cascada fisiopatológica de la lesión neuronal durante la meningitis

## 2.3. TRATAMIENTO

### 2.3.1. Principios básicos

El éxito del tratamiento de la meningitis neumocócica depende en gran parte de su rápida administración y de la adecuada elección del antibiótico. El objetivo del tratamiento es conseguir una rápida esterilización del LCR para evitar la alta incidencia de secuelas neurológicas, para lo cual deben utilizarse antibióticos con potente actividad bactericida. Para tratar adecuadamente una meningitis bacteriana las concentraciones de antibiótico en el LCR deben exceder en 10 o más veces el valor de la concentración mínima bactericida (CMB) del microorganismo. Diferentes factores determinan si se alcanza la actividad bactericida en LCR necesaria para erradicar la bacteria<sup>124,125</sup>. Entre ellos se encuentran:

#### Penetración del antibiótico en el LCR

La penetración a través de la BHE y la concentración de un antibiótico en el LCR puede verse influida por:

- ✓ *Peso molecular*: cuando mayor sea el peso molecular de la sustancia, menor será su penetración
- ✓ *Grado de ionización*. Los ácidos ionizados pasan más difícilmente del plasma al LCR, debido a que el pH del plasma es más alto que el de LCR
- ✓ *Liposolubilidad*. A mayor grado de liposolubilidad mejor penetración, lo que ocurre con antibióticos como las quinolonas, la rifampicina o el cloranfenicol
- ✓ *Grado de unión a proteínas plasmáticas*. Las sustancias con mayor grado de unión como la ceftriaxona, penetran peor en el LCR. No obstante, la unión a proteínas aumenta la vida media ( $T_{1/2}$ ) en suero y LCR, lo que retarda su eliminación
- ✓ *Interacción con el transporte activo de sustancias a través del plexo coroideo*. El probenecid actúa de manera competitiva en el transporte de los antibióticos betalactámicos

- ✓ *Grado de inflamación de las meninges.* La inflamación incrementa la permeabilidad de la BHE y por tanto el paso de sustancias como los antibióticos; además tiene un efecto inhibitorio sobre su eliminación. La disminución de la inflamación, ya sea por la acción del tratamiento o por la administración de sustancias antiinflamatorias, reduce la penetración del antibiótico. Por ello las dosis de antibiótico deben mantenerse durante todo el tratamiento, a pesar de la mejoría del paciente.

### **Modo de administración**

Un factor que también determina la respuesta al antibiótico es la forma de administrarlo. La elección entre administrar bolos intermitentes o hacerlo de forma continuada está sometida a debate. El efecto postantibiótico de algunos antimicrobianos puede contribuir al éxito terapéutico con la administración de dosis intermitentes. Otro aspecto a considerar es la vía de administración. Cuando, por las condiciones farmacocinéticas del antibiótico, no es posible lograr la concentración necesaria en el LCR por vía sistémica, el antibiótico puede administrarse por vía intratecal<sup>126</sup> o intraventricular, aunque su farmacocinética no es bien conocida.

### **Farmacocinética y farmacodinamia antibiótica**

La dosificación de los antibióticos en la meningitis no sólo depende del conocimiento de su farmacocinética (absorción, penetración y eliminación a través de la BHE), sino también de las propiedades farmacocinéticas del mismo en el LCR, de los niveles alcanzados y de la eficacia y toxicidad que de ellos se derivan. Los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos se calculan para poder establecer la dosis, el intervalo entre las mismas y la vía de administración más adecuada de un antibiótico. Debido a la baja respuesta inmune del LCR, el tratamiento antibiótico óptimo depende de la concentración bactericida en el lugar de la infección. Atendiendo a la actividad y duración del efecto bactericida, los antibióticos pueden dividirse en dos grupos<sup>124,127</sup>:

- ✓ *Concentración dependiente:* su eficacia depende de la concentración máxima ( $C_{max}$ ) alcanzada y del prolongado efecto postantibiótico; el efecto aumenta a medida que lo hace su concentración en LCR. Los aminoglucósidos y las quinolonas son fármacos cuya actividad depende

de la concentración, lo que permite intervalos de dosificación más prolongados. Los parámetros farmacodinámicos que mejor predicen la eficacia del antibiótico son:  $C_{max}/CMI$  (cociente inhibitorio entre la concentración máxima y la CMI) y  $AUC/CMI$  (cociente entre el área bajo la curva y la CMI)

- ✓ *Tiempo dependiente*: su eficacia está relacionada con el tiempo durante el cual los niveles de antibiótico están por encima de la CMI del microorganismo. Los betalactámicos son un grupo de antibióticos cuya eficacia es tiempo dependiente, lo que suele hacer necesario administrarlos a intervalos más frecuentes. El parámetro farmacodinámico que mejor indica la eficacia terapéutica es el  $t > MIC$ .

### 2.3.2. Tratamiento antimicrobiano

La meningitis neumocócica es una infección grave que requiere un tratamiento urgente y eficaz, la demora en la esterilización del LCR empeora el pronóstico del enfermo y aumenta el riesgo de padecer secuelas neurológicas<sup>128</sup>.

#### Tratamiento empírico de la meningitis neumocócica

Durante muchos años la penicilina y, en pacientes alérgicos a la penicilina, el cloranfenicol, era el tratamiento estándar en la meningitis bacteriana. Desde la aparición y rápida extensión de neumococos resistentes por todo el mundo, se ha abandonado el uso de estos antibióticos para el tratamiento empírico de la meningitis neumocócica<sup>79,129</sup>.

En países con baja prevalencia de resistencia a penicilina y en ausencia de antecedentes de alergia a la misma, las cefalosporinas de tercera generación, como cefotaxima o ceftriaxona, constituyen el tratamiento de elección en la meningitis neumocócica. Estas cefalosporinas tienen una buena penetración y pueden alcanzar concentraciones entre 3-15  $\mu g/ml$  en el LCR, además su CMI para neumococo es de 2-4 veces menor que la penicilina, de modo que los neumococos parcialmente resistentes a penicilina suelen ser sensibles a las cefalosporinas. Cefotaxima puede administrarse a dosis elevadas sin riesgo de toxicidad: 50 mg/kg/6h en niños y 75-100 mg/kg/6h (máximo 24 g/24h) en adultos. Ceftriaxona puede administrarse a dosis de 50-100 mg/kg/d en niños y

adultos, pero hasta un máximo de 4 g/d, a partir de los cuales podrían aparecer efectos secundarios. La respuesta terapéutica a dosis elevadas de cefotaxima frente a cepas con una CMI menor o igual a 2 µg/ml de cefotaxima/ceftriaxona ha sido generalmente buena<sup>130</sup>, pero la aparición de cepas con CMI superiores a 2 µg/ml (hasta 16-32 µg/ml) ha generalizado la recomendación de la asociación de cefotaxima también a dosis altas, o ceftriaxona más vancomicina como tratamiento empírico de la meningitis neumocócica<sup>131-133</sup>; no obstante, una vez comprobada la sensibilidad de la cepa causal debe retirarse la vancomicina si la cepa es sensible a las cefalosporinas. En caso de alergia a los betalactámicos, se recomienda la administración de vancomicina y rifampicina.

El uso de antibióticos no betalactámicos como la vancomicina se había sugerido como alternativa terapéutica recomendada en caso de resistencia elevada a penicilina y/o cefalosporinas, ya que el *S. pneumoniae* es universalmente sensible a la vancomicina, pero la aparición de algunos fallos terapéuticos en pacientes con meningitis tratados con este antibiótico desaconseja su uso en solitario para el tratamiento de la meningitis neumocócica<sup>11</sup>. La causa principal del fracaso terapéutico observado con la vancomicina tiene lugar porque no se alcanzan los niveles necesarios en LCR, ya que existe una gran variabilidad en la penetración en el espacio subaracnoideo, que depende del grado de inflamación de las meninges y puede modificarse en un mismo paciente durante del tratamiento, especialmente si recibe tratamiento simultáneo con dexametasona<sup>12</sup>. Las dosis de vancomicina en niños son de 15 mg/kg/6h, en adultos son algo menores (15 mg/kg/12h) y debido al riesgo de nefrotoxicidad y ototoxicidad, especialmente en las personas mayores, sus niveles en plasma deben monitorizarse. En casos excepcionales es posible su administración por vía intratecal ya que se ha demostrado su eficacia en la meningitis neumocócica resistente<sup>89</sup>.

Algunos autores han recomendado la asociación de cefotaxima/ceftriaxona más rifampicina para el tratamiento empírico de la meningitis<sup>134-136</sup>, especialmente a los pacientes que se les administra dexametasona. Al contrario de lo que ocurre con la vancomicina, el paso de la rifampicina al LCR

no se ve afectado con la administración de dexametasona. Aunque no existe experiencia clínica, algunos estudios experimentales han resultado eficaces<sup>12</sup>; además en un estudio de meningitis en el ratón la combinación de ceftriaxona con rifampicina redujo la mortalidad de los animales tratados con rifampicina, al disminuir la liberación de productos inflamatorios de la pared bacteriana<sup>137</sup>.

En todos los casos de meningitis con resistencia a cefotaxima debe repetirse la punción lumbar a las 36-48 horas de tratamiento, para comprobar la esterilización del LCR y, si es preciso, realizar modificaciones en el tratamiento<sup>138</sup>. La duración más habitual del tratamiento es de diez días. La dosificación antibiótica inicialmente administrada debe mantenerse a lo largo de todo el tratamiento, sin disminuir la dosis cuando el paciente mejora, porque a medida que disminuye la inflamación, la penetración del antibiótico también disminuye.

### **Alternativas en el tratamiento de la meningitis neumocócica**

Diferentes agentes antimicrobianos se han evaluado para el tratamiento de la meningitis neumocócica causada por cepas resistentes a penicilina y/o cefalosporinas. Los **carbapenemes** son antibióticos con alta efectividad *in vitro* frente a los principales patógenos que causan meningitis<sup>139,140</sup>, incluido el neumococo resistente a penicilina. Imipenem, el primer carbapenem que surgió, no está indicado en el tratamiento de las infecciones del sistema nervioso central ya que tiene efecto convulsivante<sup>16</sup>. Meropenem posee una potente actividad bactericida, tiene una buena penetración en el LCR<sup>18</sup> y, a diferencia de imipenem, no se ha observado convulsiones con su administración, por todo ello meropenem puede ser una buena alternativa para el tratamiento de la meningitis. En dos estudios en pacientes con meningitis, meropenem en monoterapia tuvo similar eficacia clínica y microbiológica que cefotaxima o ceftriaxona<sup>19,141</sup>. Aunque en algunos estudios en niños con meningitis neumocócica con alta resistencia a penicilina y cefalosporinas, meropenem se ha mostrado eficaz<sup>20,142</sup>, la experiencia clínica en pacientes con neumococo resistente a penicilina es limitada<sup>143</sup>. Otro carbapenem, ertapenem, ha evidenciado una actividad antineumocócica similar a los tratamientos

estándar en la meningitis experimental por cepas sensibles y resistentes a penicilina<sup>144</sup>.

Las nuevas **fluoroquinolonas** como: gatifloxacino, gemifloxacino, garefloxacino, trovafloxacino o morifloxacino tienen una buena actividad *in vitro* frente a *S. pneumoniae* resistente a penicilina. Se han estudiado en el modelo animal del conejo demostrando una excelente actividad bactericida y una eficacia comparable a la asociación de ceftriaxona más vancomicina<sup>13,145-148</sup>. En un estudio multicéntrico en niños con meningitis bacteriana (27% causada por *S. pneumoniae*), trovafloxacino mostraba una eficacia similar a ceftriaxona, con o sin vancomicina, en cuanto a esterilización del LCR y evolución de la enfermedad<sup>149</sup>. Aunque todos estos datos sugieran que las fluoroquinolonas pueden ser una excelente alternativa<sup>150</sup>, la toxicidad hepática de trovafloxacino y la toxicidad de otras fluoroquinolonas, así como la tendencia al aumento progresivo de las CMI con el desarrollo de resistencias, parece que no hacen de las quinolonas una buena alternativa para el tratamiento empírico de la meningitis neumocócica.

Actualmente existe interés en estudiar otras moléculas no relacionadas con los antibióticos descritos, que presenten un mecanismo de acción diferente y que puedan evitar los mecanismos de resistencia actualmente conocidos<sup>151</sup>. Estos nuevos fármacos con actividad frente a microorganismos multirresistentes podrían ser una verdadera alternativa en el tratamiento de la meningitis. El **linezolid** pertenece a una nueva familia de antimicrobianos: las oxazolidinonas, que actúan inhibiendo la síntesis proteica; es activo frente a la mayoría de los patógenos grampositivos, incluyendo el neumococo sensible y resistente a penicilina. Aunque hay poca experiencia en el tratamiento de la meningitis con este fármaco, en un estudio realizado en meningitis en conejos linezolid fue menos eficaz que el tratamiento estándar con ceftriaxona más vancomicina<sup>152</sup>. En un pequeño número de pacientes con meningitis neumocócica tratados con ceftriaxona más linezolid, los autores sugieren que puede ser una alternativa a la vancomicina o rifampicina, en asociación con una cefalosporina de tercera generación<sup>153</sup>.

La **daptomicina** pertenece a una nueva clase de antibióticos denominada lipopéptidos, que presenta una rápida actividad bactericida *in vitro* frente a cocos grampositivos. En un modelo de meningitis en el conejo daptomicina fue claramente mejor que el tratamiento estándar comparativo, ceftriaxona más vancomicina, en una cepa de *S. pneumoniae* resistente a penicilina, eliminando más rápidamente el inóculo bacteriano del LCR<sup>154</sup>. Es posible que en un futuro la daptomicina pudiera ser una alternativa frente a los antibióticos betalactámicos para el tratamiento de la meningitis bacteriana.

Tal como se ha podido constatar, el tratamiento empírico de la meningitis resistente a penicilina no está completamente resuelto. Con objeto de encontrar la mejor alternativa, el estudio de combinaciones antibióticas puede ser una solución, al aumentar el espectro bacteriano y disminuir el riesgo de fracaso terapéutico, especialmente cuando se utilizan de forma concomitante sustancias antiinflamatorias.

### **2.3.3. Tratamiento antiinflamatorio**

La elevada morbi-mortalidad asociada a la meningitis neumocócica parece deberse a la intensa respuesta inflamatoria que tiene lugar en el espacio meníngeo, como consecuencia de la propia infección y del tratamiento antibiótico. La administración de potentes antibióticos bacteriolíticos, como los betalactámicos, producen la liberación masiva de fragmentos de la pared celular del neumococo durante su lisis, lo que explicaría el deterioro neurológico que en ocasiones se observa una vez iniciado el tratamiento antibiótico. Para paliar este problema se ha preconizado la administración temprana de tratamiento adyuvante, con objeto de disminuir la respuesta inflamatoria, evitando así las complicaciones y mejorando el pronóstico. Estudios experimentales han demostrado que la dexametasona administrada previamente o conjuntamente con la primera dosis de antibiótico disminuye la inflamación meníngea. Se han valorado otros tratamientos en modelos experimentales de meningitis, pero sólo la dexametasona ha conseguido mostrar un efecto antiinflamatorio eficaz, que la ha capacitado para ser utilizada como tratamiento adyuvante de la meningitis.

### Tratamiento con dexametasona

Durante años se ha debatido el papel de la dexametasona en la atenuación de la respuesta inflamatoria, con la consiguiente disminución de la mortalidad y de las secuelas de la meningitis. En los últimos años diversos estudios han ayudado a clarificar el tema. En un metaanálisis de estudios clínicos publicados entre 1988-1996<sup>155</sup> se observó una disminución de secuelas neurológicas y auditivas en niños con meningitis por *H. Influenzae* y, también mostró un claro beneficio en la meningitis neumocócica, si la dexametasona se administra antes o junto con el antibiótico. En los adultos, la publicación de un estudio multicéntrico europeo a doble ciego<sup>156</sup> ha demostrado de forma incuestionable la utilidad de la dexametasona administrada minutos antes o al mismo tiempo que el tratamiento antibiótico, ya que reduce la mortalidad del 34% al 15% en la meningitis neumocócica. El tratamiento con dexametasona en adultos con meningitis neumocócica podría reducir tanto las complicaciones sistémicas, como las neurológicas<sup>157</sup>.

A pesar de estos estudios clínicos que han demostrado los beneficios del tratamiento adyuvante con dexametasona en niños y adultos con meningitis bacteriana, su uso no está exento de inconvenientes:

- ✓ En modelos experimentales de meningitis en ratas y conejos, la dexametasona aumentó los fenómenos de apoptosis neuronal, observándose déficit de aprendizaje<sup>120,158</sup>.
- ✓ En el modelo animal, la administración conjunta de dexametasona y vancomicina, disminuye significativamente la penetración de vancomicina en el LCR, retrasando la erradicación del neumococo<sup>159,160</sup>.

En zonas con alta resistencia a penicilina y cefalosporinas, algunos autores recomiendan administrar rifampicina más una cefalosporina de tercera generación, o bien la triple combinación de vancomicina, rifampicina y cefalosporina, cuando se administra dexametasona como adyuvante, ya que la penetración en el LCR de la rifampicina y de la ceftriaxona no se vería prácticamente modificada<sup>159</sup>.

Las directrices para el uso de dexametasona en la meningitis neumocócica varían según la edad del paciente<sup>133,136</sup> y existen pequeñas variaciones según los autores.

- ✓ No suele recomendarse en el periodo neonatal, ya que la mayoría de estudios se han realizado en microorganismos no habitualmente responsables de meningitis en esta etapa de la vida y los resultados no son extrapolables.
- ✓ En niños mayores de seis semanas de edad, se recomienda considerar posibles riesgos y beneficios. Se administra a una dosis de 0,6 mg/kg/d, fraccionada cada 6 o 12 horas, durante dos o cuatro días.
- ✓ En los adultos con meningitis neumocócica se administra a una dosis de 0,15 mg/kg/d cada 6 horas, durante 2-4 días.

### **Alternativas en el tratamiento antiinflamatorio**

El mejor conocimiento de los mediadores que contribuyen a la migración de los leucocitos, al aumento de la permeabilidad de la BHE durante la meningitis y, en consecuencia, a la lesión neuronal, ha propiciado estrategias de tratamientos adyuvantes con sustancias inhibitoras de estos mediadores, que han sido estudiadas en diversos modelos experimentales y en animales genéticamente modificados<sup>161</sup>. Entre ellos se encuentran: antioxidantes como la N-acetilcisteína, inhibidores de las metal-proteinasas de la matriz, del TNF- $\alpha$ , de las caspasas o de citocinas como la IL-1 $\beta$ .

No obstante, hay que tener presente que la respuesta inflamatoria puede tener un cierto efecto protector y la inhibición de alguno de estos mediadores podría agravar la enfermedad y las complicaciones de la misma. Las futuras estrategias terapéuticas de tratamiento adyuvante tendrían que ir encaminadas a disponer de sustancias que actúen en las etapas más precoces del proceso inflamatorio, evitando así las lesiones neuronales que ocasiona la meningitis bacteriana.

### **3. Modelos de infección experimental**

#### **3.1. EXPERIMENTACIÓN ANIMAL E INVESTIGACIÓN**

Desde hace muchos años se han venido utilizando los modelos animales para evaluar la actividad, toxicidad o efectos teratógenos de diferentes sustancias. La importancia que los modelos animales han tenido en el avance de la investigación biológica y médica es incuestionable. No obstante, existen muchos detractores al uso de animales para experimentación y desde hace tiempo se han establecido directrices de buenas prácticas, como la de las tres **R** descrita por Russell<sup>162</sup>:

- ✓ **Reducción** del número de animales: utilizando la menor cantidad posible de animales, definiendo previamente las condiciones que puedan aumentar la variabilidad de los resultados.
- ✓ **Refinamiento** del estudio: estableciendo bien el protocolo del estudio y utilizando técnicas que minimicen el dolor o el estrés de los animales y aumenten su bienestar.
- ✓ **Reemplazamiento** del uso de animales: utilizando métodos alternativos como cultivos celulares o modelos *in vitro*, siempre que sea posible, o bien empleando otras especies animales que sean inferiores en la escala filogenética animal.

Actualmente, la investigación que utiliza animales está perfectamente regulada, tanto a nivel autonómico como estatal. En Catalunya por el Decret 214/1997 de 30 de julio y a nivel estatal por el Real Decreto 1201/2005, de 10 octubre de 2005, y el protocolo de trabajo debe ser aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal. Además, para garantizar al máximo el bienestar animal, el personal que trabaja directamente con animales (investigadores, técnicos y personal del estabulario) debe realizar un curso de formación como usuarios de animales de experimentación.

Los modelos animales de infección intentan reproducir la enfermedad de los humanos tanto como sea posible y reflejar los aspectos morfológicos y

fisiopatológicos de la enfermedad humana<sup>163</sup>. Un modelo “ideal” de infección debería tener las siguientes características:

- ✓ La puerta de entrada y la vía de diseminación en el organismo deben ser lo más parecidas a lo que ocurre en el ser humano.
- ✓ El microorganismo debe ser patógeno en el animal de experimentación y en los humanos.
- ✓ La gravedad y el curso de la enfermedad debe ser predecible, reproducible y de suficiente duración para permitir la evaluación del tratamiento antimicrobiano.
- ✓ La técnica de infección debe ser relativamente simple.

Los modelos animales de infección son el paso intermedio entre los estudios *in vitro* y la administración de antibióticos en la clínica, y son la base de los ensayos preclínicos que se llevan a cabo para comercializar un nuevo antibiótico, según la FDA (Food and Drug Administration) y la Agencia Europea para la Evaluación de Productos Médicos, ya que no hay ningún método alternativo para sustituirlos.

No obstante, los modelos animales también tienen limitaciones, como la dificultad para reproducir exactamente la enfermedad humana o las diferencias farmacocinéticas de los fármacos en los animales y en el hombre, que no permite dosificar de la misma forma. Para paliar este último aspecto, hemos de ajustar los parámetros farmacodinámicos a los humanos, lo que suele comportar administrar dosis más elevadas del fármaco y disminuir el intervalo entre las mismas, para compensar la rápida eliminación que se produce en los animales<sup>164</sup>. Aunque los datos obtenidos en los modelos animales de infección no son directamente extrapolables a los humanos, son una referencia importante para iniciar la investigación clínica.

### **3.2. MODELOS ANIMALES DE MENINGITIS**

Aunque las primeras aproximaciones a modelos de meningitis experimental datan de finales del siglo XIX, fue a partir de los años cuarenta cuando se empezó a utilizar algunos antibióticos y, ha sido en las últimas décadas cuando se han publicado una amplia variedad de modelos de meningitis que utilizaban

diferentes animales incluyendo ratones, ratas, cobayas, cerdos y conejos. La gravedad de la meningitis ha propiciado el desarrollo de modelos animales con objeto de conocer mejor los complejos mecanismos patogénicos y fisiopatológicos de la enfermedad, la acción de fármacos antiinflamatorios como tratamiento adyuvante, así como para evaluar la eficacia y la farmacocinética de nuevos tratamientos antibióticos, especialmente necesarios desde la aparición en todo el mundo de bacterias multirresistentes.

Tal como se ha comentado en el apartado de la fisiopatología, el desarrollo de la meningitis tiene lugar en varias etapas desde que el microorganismo penetra en el organismo hasta que se produce la meningitis sintomática. La superación de estas etapas depende de la virulencia del microorganismo y de la inmunocompetencia del huésped. Las primeras etapas son comunes a todos los patógenos que ocasionan bacteriemia, pero las últimas son específicas de la meningitis bacteriana.

Mediante los modelos animales se pueden estudiar todas las fases de la meningitis, aunque la información obtenida dependerá fundamentalmente del lugar donde se realice la inoculación<sup>165</sup>. Cuando la bacteria se inocula a los animales por vía intranasal, oral, subcutánea o intraperitoneal obtenemos información sobre aspectos de la bacteria y del huésped para provocar bacteriemia y su potencialidad para invadir el SNC. Por el contrario, en los modelos animales en los que el patógeno se inocula directamente en el LCR, se estudian mejor las últimas etapas de la enfermedad, y son muy útiles para valorar aspectos de la interacción entre el patógeno y el huésped, así como para evaluar potenciales tratamientos.

Estos últimos modelos tienen una patogénesis artificial, ya que no se diseminan por vía hematológica como ocurre habitualmente en la enfermedad humana y se saltan las primeras etapas de la enfermedad, pero tienen la ventaja de producir infección letal en un tiempo predecible. Además los animales adultos no siempre desarrollan meningitis después de la inoculación con organismos vivos por vía intranasal o intraperitoneal, a diferencia de los animales recién nacidos,

por lo que la vía intracisternal se ha convertido en una de las de mayor fiabilidad para producir meningitis experimental<sup>166</sup>.

Dos modelos animales de meningitis destacan de forma especial por la relevancia que han tenido para la enfermedad humana y por la profusión de información que han generado; el primero es el modelo de meningitis por *H. Influenzae*<sup>167</sup> en ratas recién nacidas y el segundo el de meningitis neumocócica en conejos adultos<sup>168</sup>. Ambos modelos son complementarios si se tiene en cuenta las etapas involucradas en la patogenia de la meningitis<sup>169</sup>. El modelo de la rata permite estudiar mejor las primeras etapas de la enfermedad, mientras que el conejo es especialmente útil en las últimas etapas, sobre todo para estudiar nuevos tratamientos.

La elección de un modelo animal u otro es un aspecto crucial, no exclusivamente en el estudio de la patogenia de la enfermedad, sino también para estudiar la eficacia de los antibióticos. Meropenem es un antibiótico que en los humanos es estable frente a las DHP-I renales y, a diferencia, de imipenem no requiere la administración conjunta de un inhibidor enzimático, la cilastina. No obstante, este comportamiento no es homogéneo en todas las especies animales comúnmente utilizadas en laboratorios de experimentación; meropenem es fácilmente hidrolizado en el conejo mientras que muestra mayor resistencia en la cobaya<sup>21</sup> y este hecho puede interferir en los resultados de los estudios de eficacia cuando se analiza este antibiótico.

### **3.3. MODELO DE MENINGITIS EN EL CONEJO**

Aunque existen otros modelos de meningitis como el del cerdo recién nacido descrito por Park<sup>170</sup>, que tiene muchas similitudes con la meningitis neonatal en humanos, en cuanto a tamaño y desarrollo del cerebro, el modelo de meningitis en el conejo, desarrollado por Dacey y Sande en 1974, continúa siendo el modelo más utilizado para evaluar alternativas terapéuticas y para estudiar el proceso inflamatorio que se genera en la infección meníngea. Este modelo fue innovador porque utilizó un aparato de estereotaxia que facilita la toma de muestras seriadas de LCR por vía intracisternal.

Muchos aspectos de la patogenia de la meningitis y de los mecanismos que se asocian a la lesión cerebral, como la ruptura de la integridad de la BHE, el aumento de la presión intracraneal, el desarrollo de edema cerebral y la alteración de la circulación cerebral, se han comprendido gracias a este modelo animal. Toda la cascada inflamatoria se ha conocido gracias a los modelos animales de meningitis, especialmente el del conejo, determinando la concentración de citocinas en el LCR después de la inoculación de bacterias vivas, productos de la pared celular o polisacáridos.

Con este modelo descrito por Dacey se han evaluado un gran número de antibióticos y desde el aumento creciente de la resistencia del neumococo a la penicilina y a las cefalosporinas de tercera generación, se ha utilizado el modelo de meningitis neumocócica en el conejo para evaluar otras alternativas terapéuticas o posibles combinaciones de fármacos que puedan ser más eficaces en el tratamiento de la meningitis neumocócica. También han sido fundamentales los estudios realizados con la dexametasona y otros productos antiinflamatorios.

Las principales ventajas de este modelo son el relativo mayor tamaño del conejo que permite obtener diferentes muestras de sangre y LCR para múltiples determinaciones, la posibilidad de utilizar diferentes inóculos y la facilidad para medir parámetros fisiopatológicos. Por el contrario, la principal limitación de este modelo es la forma artificial de provocar la infección, por inoculación directa, que no es igual que en la enfermedad humana. Además, la punción repetitiva en el espacio subaracnoideo puede provocar lesiones importantes e incluso la muerte del animal.

#### **3.4. MODELO DE MENINGITIS EN LA COBAYA**

Este modelo animal, con menor difusión que el del conejo, ha sido utilizado para inducir meningitis por diversos gérmenes y para estudiar la respuesta a diferentes antibióticos, especialmente meropenem<sup>25,171</sup> que no se puede utilizar en algunos modelos animales por su susceptibilidad a hidrolizar la DHP-I. El modelo de meningitis por *S. pneumoniae* en cobayas es particularmente utilizado en la investigación de enfermedades del oído, porque la inoculación

intratecal provoca meningitis/laberintitis<sup>172</sup> similar a la de la enfermedad humana y principal responsable de la sordera que tiene lugar después de la meningitis.

Las limitaciones de este modelo de meningitis experimental son similares a las de otros modelos que utilizan animales de pequeño tamaño, sólo permite obtener una muestra biológica o como mucho dos, por cada animal y se tiene que sacrificar a grupos de animales distintos en cada punto horario para conocer la evolución en el tiempo. Además, al igual que en modelo del conejo la patogenia de la meningitis es artificial.

## 4. Antibióticos

### 4.1. MEROPENEM

Meropenem es un antibiótico betalactámico semisintético perteneciente al grupo de los carbapenemes, estos antibióticos derivan de la tienamicina, metabolito producido por una bacteria denominada *Streptomyces cattleya*. Se caracterizan por estar dotados de un gran poder bactericida y por ser el grupo de betalactámicos con un espectro de actividad más amplio, porque son muy estables frente a betalactamasas, incluidas las de espectro ampliado. Los tres antibióticos de este grupo, imipenem, meropenem y el más recientemente comercializado ertapenem presentan actividad frente a bacterias grampositivas (incluido *S. aureus* meticilín sensible), gramnegativas y anaerobias. Además imipenem y meropenem presentan actividad frente a *Pseudomonas*. El meropenem es activo sobre los principales agentes de las meningitis extrahospitalarias y nosocomiales. Las cepas de *S. pneumoniae* resistentes a penicilina muestran CMI más elevadas frente a imipenem y meropenem pero ambos se mantienen sensibles. Comparando meropenem con otros antimicrobianos, éste es en general dos o cuatro veces más activo que penicilina frente a *S. pneumoniae* y ligeramente menos activo que imipenem<sup>139,173</sup>. Los puntos de corte de susceptibilidad a meropenem para *S. pneumoniae* se encuentran en la tabla 3-3.

Meropenem			
<i>S. pneumoniae</i>	Sensible	Resistencia intermedia	Resistente
Valores CMI	≤ 0,25 µg/ml	0,5 µg/ml	≥ 1 µg/ml

**Tabla 3-3.** Puntos de corte de susceptibilidad a meropenem para *S. pneumoniae*

### **Estructura química**

La estructura básica de los carbapenemes, al igual que la de las penicilinas, consiste en un anillo  $\beta$ -lactámico fusionado a uno pirrodilínico compartiendo un nitrógeno. Las sustituciones químicas de las cadenas laterales y su disposición espacial condicionan una mayor afinidad por las proteínas fijadoras de penicilina (PBP) diana, un incremento de la potencia, del espectro antibacteriano y de la resistencia a las betalactamasas.

La N-formimidoil tienamicina o imipenem, es un derivado estable de la tienamicina, que es ampliamente metabolizado en el riñón cuando se administra a diferentes especies animales. Se inactiva por la DHP-I una carbapenemasa humana, localizada en las células en cepillo de las paredes de los túbulos proximales, dando lugar a una escasa eliminación urinaria de imipenem y a la formación de productos nefrotóxicos que, en animales, conduce a una necrosis tubular aguda. Para paliar este problema el imipenem se debe administrar conjuntamente con cilastina, un inhibidor de la DHP-I que bloquea el metabolismo renal de imipenem.

En 1994 se introdujo meropenem, que estructuralmente se diferencia de imipenem por la presencia de un grupo  $\beta$ -metilo en posición C1 que confiere a la molécula estabilidad frente a la DHP-I renal, por lo que no es necesario administrarlo junto con un inhibidor enzimático. No obstante, este comportamiento no es homogéneo en todas las especies animales comúnmente utilizadas en laboratorios de experimentación; meropenem es fácilmente hidrolizado en el conejo mientras que muestra mayor resistencia en el cobaya<sup>21</sup>. Esta diferencia en la estructura química es posiblemente también responsable de la reducción del efecto proconvulsante observado en imipenem/cilastina que no permitía su utilización en el tratamiento de la meningitis bacteriana<sup>174</sup>.

### **Mecanismo de acción**

Los carbapenems son antibióticos bactericidas que producen una muerte celular rápida al unirse covalentemente a las PBP esenciales e inhibir la síntesis del peptidoglicano, componente de la pared bacteriana que le confiere

rigidez y estabilidad y la protege de la ruptura osmótica. El peptidoglicano está formado por largas cadenas de dos pentapéptidos intercalados: N-acetilglucosamida y ácido acetilmurámico, que se unen entre sí para formar una malla. Los betalactámicos inhiben esta unión o transpeptidación, última etapa de la síntesis de la pared bacteriana y secundariamente provocan una lisis de la misma al perderse la acción estabilizadora antiosmótica de la pared. Para que estos antibióticos actúen es necesario que las bacterias estén en fase de multiplicación, ya que es cuando se sintetiza la pared celular<sup>174</sup>.

Los carbapenemes son capaces de unirse de forma prolongada a las PBP y de este modo tienen la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano aunque la concentración del antibiótico esté por debajo de la concentración mínima inhibitoria, fenómeno que se conoce como efecto postantibiótico (EPA) y que le confiere una acción más prolongada.

### **Farmacocinética y farmacodinamia**

El meropenem presenta un perfil farmacocinético similar a otros betalactámicos, tras la administración intravenosa de 1 g se alcanzan concentraciones séricas máximas ( $C_{max}$ ) de 61,6 mg/l y tiene una vida plasmática de aproximadamente 1 hora. El área bajo la curva (ABC) es de 90,8 mg/h/l. La unión a proteínas es inferior al 10%<sup>175</sup>.

Meropenem presenta una buena distribución en fluidos y tejidos corporales, aunque tiene una baja penetración en LCR en ausencia de inflamación meníngea. Sin embargo, la penetración aumenta considerablemente en presencia de meningitis, como consecuencia de la inflamación. En un estudio realizado por Dagan en pacientes con meningitis aguda<sup>18</sup>, se observó que después de una dosis de meropenem de 40 mg/kg, las concentraciones en LCR variaron entre 0,9 y 6,5 µg/ml, con porcentajes de penetración que oscilaban el 2 y el 52%, según el grado de inflamación de la BHE. En la tabla 1-4 se reflejan las concentraciones pico de meropenem en algunos estudios en pacientes con meningitis bacteriana y en conejos con meningitis neumocócica. En la meningitis, meropenem alcanza niveles en LCR superiores a las CIM de los agentes causales habituales, no habiéndose detectado efectos secundarios

en el SNC. La eliminación es fundamentalmente renal (75%), por lo que en pacientes con insuficiencia renal se debe ajustar la dosis.

	<b>Meropenem dosis (iv)</b>	<b>Nivel pico suero (µg/ml)</b>	<b>Nivel pico LCR (µg/ml)</b>	<b>Referencia</b>
Humanos	40 mg/kg	284 ± 160	2,8 ± 2,5	18
Conejos	125 mg/kg	31 ± 15	2,0 ± 1,3	23
Conejos	125 mg/kg	-	3,75 ± 4,48	22

**Tabla 1-4.** Niveles pico de meropenem en pacientes con meningitis bacteriana y en conejos con meningitis neumocócica

La actividad de meropenem se ve mínimamente influida por el tamaño del inóculo y, a diferencia de imipenen, la CIM no se altera en medio ácido. Meropenem tiene frente a la mayor parte de los microorganismos CMB iguales o sólo dos o cuatro veces más elevadas que sus CIM. El efecto bactericida de los betalactámicos es relativamente independiente de la concentración plasmática; la actividad bactericida y probablemente la eficacia clínica guarde más relación con el tiempo que dicha concentración excede la CIM o T>MIC. Para la mayoría de infecciones se considera suficiente que el 40-50% del tiempo la concentración esté por encima de la CIM, aunque en las meningitis probablemente sería mejor que estuviera todo el tiempo por encima de CIM<sup>176</sup>.

### **Dosificación y administración**

Meropenem se administra únicamente por vía parenteral. La dosificación se establece dependiendo de la etiología, localización y gravedad de la infección. La dosificación habitual en adultos es de 0,5-1 g/6-8 horas y de 2 g/8 horas iv para el tratamiento de la meningitis. En niños con meningitis la dosis recomendada es de 40 mg/kg/8 horas iv. Las dosis de meropenem deberán adecuarse cuando existe insuficiencia renal ya que su eliminación es predominantemente renal<sup>175</sup>.

## Efectos adversos

Los efectos adversos son poco frecuentes y semejantes a los que producen otros antibióticos betalactámicos siendo los más frecuentes los digestivos y el exantema. Se ha observado sensibilidad cruzada entre los carbapenemes y otros betalactámicos como penicilina o cefalosporinas hasta en un 5-15%.

Imipenem se ha asociado a la aparición de convulsiones, sobre todo en pacientes con patología subyacente del SNC o función renal disminuida y se ha observado hasta en un 33% durante el tratamiento de meningitis en niños, motivo por el cual imipenem no está indicado en el tratamiento de la meningitis. Por el contrario, meropenem tiene una incidencia de convulsiones de aproximadamente el 0,3%, no existiendo diferencias significativas con otros betalactámicos como cefalosporinas<sup>19</sup>.

## 4.2. RIFAMPICINA

La rifampicina es un derivado semisintético de la rifampicina B, un antibiótico macrocíclico producido por *Streptomyces mediterranei*. Se describió en los años 60 como tratamiento de las infecciones por grampositivos y gramnegativos. Desde entonces ha sido uno de los fármacos más utilizados en el tratamiento de la tuberculosis debido a su alto índice de eficacia.

### Mecanismo de acción

La rifampicina se une de forma no covalente a la unidad  $\beta$  del core enzimático de la ARD-polimerasa, dependiente del ADN de las bacterias, de este modo la enzima bloquea la transcripción. La rifampicina es un antibiótico de amplio espectro, activo frente a micobacterias tanto típicas como atípicas, y bacterias grampositivas y gramnegativas; es bactericida para microorganismos tanto intra como extracelulares. Es eficaz frente a prácticamente todos los cocos y bacilos grampositivos aerobios y anaerobios, incluidos los neumococos resistentes a penicilina. Existe discordancia entre la actividad antineumocócica *in vitro* y *in vivo*, mientras *in vitro* se observa un efecto bacteriostático, en el modelo animal del conejo es bactericida a una dosis de 15 mg/kg/d<sup>177,178</sup>.

### Farmacocinética y farmacodinamia

La rifampicina se absorbe muy bien por vía oral, aunque la administración conjunta con alimentos reduce aproximadamente en un 20% su absorción. La administración de 600 mg por vía intravenosa da lugar a unas concentraciones plasmáticas de 17 µg/ml. La fijación a proteínas plasmáticas es de un 75-80%<sup>179</sup>. La rifampicina se distribuye ampliamente por tejidos y fluidos orgánicos y, gracias a su carácter liposoluble, penetra bien en el LCR, especialmente cuando las meninges están inflamadas, siendo ésta del orden del 7-56% en los humanos y de un 18-22% en los conejos<sup>126</sup> y su penetración no se ve modificada por la administración de dexametasona<sup>12</sup>. En la tabla 1-5 se reflejan las concentraciones pico de rifampicina en algunos estudios en pacientes con meningitis bacteriana y en conejos con meningitis neumocócica. La rifampicina tiene una vida media en LCR del orden de 14 horas, lo que permite administrar una sola dosis en el tratamiento de las infecciones del SNC.

La rifampicina se metaboliza en el hígado y hasta un 50% de la forma original se elimina por riñón y vías biliares.

	Rifampicina Dosis (iv)	Nivel pico suero (µg/ml)	Nivel pico LCR (µg/ml)	Referencia
Humanos	20 mg/kg	5,1 ± 3,0	1,0 ± 0,5	180
Conejos	10 mg/kg	23,1 ± 9,7	0,8 ± 0,3	14
Conejos	15 mg/kg	19 ± 5	0,4 ± 0,3	23
Conejos	20 mg/kg	66 ± 26,5	1,9 ± 0,8	14

**Tabla 1-5.** Niveles pico de rifampicina en pacientes con meningitis bacteriana y en conejos con meningitis neumocócica

### Dosificación y administración

La rifampicina se puede administrar por vía oral y por vía parenteral. En los adultos, la dosis más utilizada es la de 10 mg/kg/d con un máximo de 600 mg si el peso es superior a 50 kg, y de 450 mg si es inferior a 50 kg, aunque puede

administrarse 600-1200 mg/d (10-20 mg/kg/d). En niños, la dosis recomendada es de 10-20 mg/kg/d, con un máximo de 600 mg/d. No es necesario modificar las dosis en pacientes con insuficiencia renal, pero hay que reducirlas en casos de insuficiencia hepática grave o ictericia obstructiva<sup>181</sup>.

### **Resistencias**

La principal limitación que presenta la rifampicina es que desarrolla resistencias a los microorganismos muy rápidamente si se utiliza en monoterapia<sup>182</sup>. El mecanismo de resistencia se produce por cambios de la ARN polimerasa codificados por mutaciones cromosómicas puntuales, aunque para *S. pneumoniae* tiene un bajo nivel de resistencia (CMI:  $\geq 0,5$  y  $\leq 4$   $\mu\text{g/ml}$ )<sup>182,183</sup>.

### **Efectos adversos e interacciones**

Las reacciones adversas con la administración de rifampicina no suelen ser muy frecuentes y las más importantes están relacionadas con la hepatotoxicidad, pudiendo provocar aumento de la bilirrubina, transaminasas y fosfatasa alcalina. La administración de rifampicina puede teñir de un color rojo-anaranjado la orina, heces, saliva, sudor y lágrimas, sin que ello tenga ninguna importancia especial.

La rifampicina es un potente inductor enzimático, por lo que puede acelerar el aclaramiento de muchos fármacos, que se metabolizan por medio del citocromo P<sub>450</sub>.

## II. Hipótesis y Objetivos



## 1. Hipótesis de trabajo

Los estudios *in vitro* valoran la actividad antimicrobiana de uno o varios antibióticos, pero no tienen en cuenta el entorno fisiológico e inmunológico que proporciona el modelo animal. El modelo de meningitis experimental nos permitirá una valoración más fiable de la eficacia de determinados antibióticos en el tratamiento de la enfermedad, así como estudiar la respuesta inflamatoria inducida por los mismos.

Es muy importante utilizar el modelo animal adecuado en función del antibiótico que queramos estudiar. Meropenem es un antibiótico que en los humanos es estable frente a las DHP-I renales, pero este comportamiento no es homogéneo en todas las especies animales comúnmente utilizadas en laboratorios de experimentación; meropenem es fácilmente hidrolizado en el conejo mientras que muestra mayor resistencia en la cobaya y este hecho puede interferir en los resultados de los estudios de eficacia cuando se analiza este antibiótico.

Las hipótesis planteadas en este trabajo son:

- ✓ Meropenem podría ser una alternativa terapéutica en el tratamiento de la meningitis neumocócica, aunque pueden existir diferencias en la eficacia del tratamiento en las cepas sensibles o resistentes a  $\beta$ -lactámicos.
- ✓ La combinación con rifampicina podría mejorar el tratamiento en las cepas resistentes y evitar la aparición de resistencia a rifampicina.
- ✓ Los dos modelos animales serán congruentes en sus resultados.
- ✓ Si los dos modelos no son congruentes por fracaso en el conejo y éxito en el cobaya, el modelo en el conejo no se considerará adecuado para el estudio de meropenem.
- ✓ Probablemente existirá congruencia entre los estudios *in vitro* y los modelos animales.

## 2. Objetivos

1. Determinar la capacidad de generar meningitis de dos cepas de *S. pneumoniae* con diferente sensibilidad a  $\beta$ -lactámicos en dos modelos animales, el del conejo y el de la cobaya.
2. Establecer y ajustar los parámetros farmacocinéticos/farmacodinámicos en LCR de meropenem y rifampicina en los mismos modelos.
3. Evaluar la eficacia terapéutica y la respuesta inflamatoria de meropenem y rifampicina solos y combinados, frente a dos cepas con diferente sensibilidad a  $\beta$ -lactámicos, utilizando los modelos de meningitis en conejo y en cobaya.
4. Comprobar si hay congruencia entre los modelos de cobaya y conejo.
5. Determinar si el modelo de meningitis en conejo puede utilizarse para estudiar meropenem.
6. Estudiar la actividad *in vitro* de meropenem y rifampicina en solitario y en combinación frente a las cepas objeto de estudio.

### III. Diseño del estudio



El trabajo consiste en la realización de dos tipos de estudios: uno *in vitro*, en el laboratorio, y otro *in vivo*, en el animal de experimentación. En ambos se ensayan varias pautas terapéuticas frente a dos cepas de *S. pneumoniae* con diferente sensibilidad a  $\beta$ -lactámicos, valorando parámetros tanto bioquímicos como microbiológicos. Este trabajo se ha llevado a cabo en el Laboratorio de Infección Experimental, dependiente del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital de Bellvitge y del Departamento de Ciències Clínicas de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona.

Los estudios *in vitro*, mediante curvas de letalidad, nos proporcionan información sobre la dinámica de la actividad antibacteriana y nos permite observar recrecimientos bacterianos y/o la aparición de resistencias a los antibióticos estudiados, que nos indica fracaso terapéutico. Pero estos estudios carecen del entorno fisiológico e inmunológico que nos aporta el modelo experimental.

Los estudios *in vivo* se realizaron utilizando dos modelos animales de meningitis, el del conejo y el de la cobaya. Los protocolos con animales fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universitat de Barcelona y los experimentos se llevaron a cabo en el Estabulario del Campus de Bellvitge de dicha Universidad.

## **1. Cepas de estudio**

En el estudio *in vivo* con el modelo de meningitis en el conejo y en la cobaya, así como en las curvas de letalidad *in vitro* se utilizaron dos cepas de *S. pneumoniae*, obtenidas de aislamientos clínicos (LCR) del Hospital Universitari de Bellvitge (HUB), Barcelona.

**Cepa HUB SIII:** pertenece al serotipo 3 y es sensible a penicilina y cefalosporinas.

**Cepa HUB 2349:** pertenece al serotipo 23F y es resistente a penicilina y cefalosporinas, presentando una relación muy común entre los neumococos

resistentes a  $\beta$ -lactámicos, la CMI a penicilina es superior a la CMI a C3G<sup>4</sup>. Esta cepa fue aislada de un paciente con meningitis pneumocócica que presentó fracaso terapéutico con el tratamiento convencional.

Las CMIs y CMBs ( $\mu\text{g/ml}$ ) de las dos cepas para penicilina (PEN), ceftriaxona (CRO), meropenem (MPN) y rifampicina (RIF) se determinaron por el método de macrodilución, siguiendo las directrices del CLSI<sup>184</sup> y se reflejan en la tabla 3.1.

<b>CMI/CMB</b>	<b>PEN</b>	<b>CRO</b>	<b>MPN</b>	<b>RIF</b>
<b>HUB 2349</b>	4/4	2/4	0,5/1	0,06/0,12
<b>HUB SIII</b>	0,01/0,01	0,01/0,01	0,01/0,01	0,03/0,06

**Tabla 3.1.** CMIs y CMBs ( $\mu\text{g/ml}$ ) de las dos cepas de estudio

## **2. Estudios *in vitro*: curvas de letalidad**

Este método valora la dinámica de la actividad de los antibióticos, solos o en combinación, a lo largo de un periodo de tiempo de 24 horas, mediante el recuento del número de bacterias viables a unas horas determinadas. Se evaluó la actividad bactericida de meropenem y rifampicina en solitario y en combinación. Las concentraciones de los antibióticos se seleccionaron en función de los niveles alcanzables en el LCR de los humanos. En la cepa resistente a penicilina y cefalosporinas, meropenem se estudió en un rango de concentraciones desde 4xCMI hasta 1/4xCMI, y rifampicina desde 8xCMI hasta 1/4xCMI. En cuanto a la cepa sensible, se escogieron concentraciones de meropenem desde 8xCMI hasta 1/4xCMI, y rifampicina desde 32xCMI hasta 1/4xCMI. En las combinaciones, meropenem y rifampicina se asociaron a concentraciones de 1xCMI, 1/2xCMI y 1/4xCMI.

Los antibióticos se diluyeron a diferentes concentraciones que se validaron mediante la determinación de las CMI's por microdilución con *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 como cepa control. Las curvas de letalidad se efectuaron utilizando tubos de 10 ml de caldo Mueller-Hinton suplementado con cationes y con un 5% de sangre lisada de caballo, en los que se añadieron las diferentes concentraciones de los antibióticos en solitario o combinados (0,1 ml en solitario o 0,2 ml en combinación). Posteriormente se añadió a cada tubo 0,1 ml de un inóculo final de *S. pneumoniae* de entre  $5 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  ufc/ml. Para tener un control del crecimiento, se preparó también un tubo en el que sólo se añadió el inóculo. Los tubos se incubaron durante 24 horas en una estufa en agitación a 37°C. Se tomaron muestras de cada tubo a las 0, 6 y 24 horas de incubación, efectuando diluciones seriadas (1:10) en SF que posteriormente se sembraron en placas de TSA-5% SB y se incubaron hasta el día siguiente. La actividad bactericida se calculó para cada concentración de antibiótico o combinación, a partir del descenso de los recuentos bacterianos obtenidos a lo largo del tiempo. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Se definió efecto bactericida a la reducción de  $\geq 3$  log ufc/ml respecto al inóculo inicial. Se consideró que la combinación antibiótica era sinérgica cuando conseguía una disminución  $\geq 2$  log ufc/ml respecto al antibiótico en solitario más eficaz, siempre y cuando al menos uno de los antibióticos se estudiase a una concentración subinhibitoria. Por último, se definió efecto aditivo o indiferente de una combinación a la reducción de entre 1-2 log ufc/ml y de  $\pm 1$  log ufc/ml, respectivamente, comparado con el antibiótico más activo en solitario.

En los tubos con antibiótico que a las 24 horas presentaban una concentración bacteriana superior que a las 6 horas, se estudió la posible adquisición de resistencia antibiótica con un cambio en la CMI, mediante la técnica de E-test.

### **3. Modelo de meningitis en el conejo**

El modelo de meningitis neumocócica en el conejo se basa en el descrito por Dacey y Sande en 1974<sup>168</sup>. En una primera etapa se llevaron a cabo una serie de experimentos para ajustar el modelo y estudiar el comportamiento de las cepas de estudio en ausencia de tratamiento. Se estudió la infección meníngea por *S. pneumoniae* en función de diferentes parámetros como: el inóculo bacteriano, los recuentos bacterianos en los diferentes puntos horarios o la supervivencia de los animales, con objeto de ajustar los parámetros para conseguir un modelo útil en los estudios de eficacia terapéutica que se realizarían posteriormente. Antes de los experimentos terapéuticos se realizaron estudios farmacocinéticos en conejos infectados con una de las cepas de neumococo, para seleccionar las dosis de antibiótico más adecuadas.

#### **3.1. ANIMALES**

Se utilizaron conejos blancos de Nueva Zelanda hembras, con un peso entre 1,8 y 2,2 kg. Los animales llegaban al estabulario una semana antes de ser utilizados, para permitir su aclimatación y para comprobar que no desarrollaban ninguna patología. Durante este periodo disponían de agua y pienso *ad libitum*.

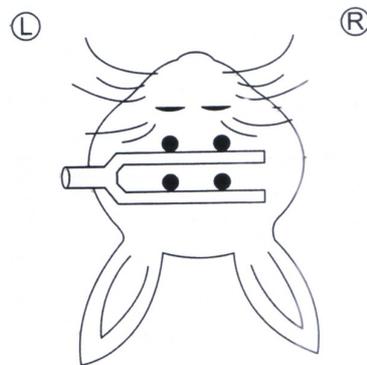
#### **3.2. MODELO EXPERIMENTAL**

El día anterior al inicio de los experimentos se debe realizar una pequeña intervención o “capping” para fijarles un casco de cemento acrílico en la calota craneal que permita la colocación del animal en un aparato de estereotaxia donde se realizará la extracción de LCR a lo largo del experimento.

##### **3.2.1. Capping**

Antes de iniciar la cirugía, los animales se anestesian con una mezcla de ketamina (35 mg/kg) y xilacina (5 mg/kg) vía intramuscular. Una vez dormidos se administra 1,5 mg de meloxicam vía subcutánea para reducir la inflamación y el dolor postoperatorio tras la cirugía, y se procede a rasurar y desinfectar las orejas, la calota craneal y la parte posterior del cuello. A continuación, y sobre

un campo quirúrgico estéril, se realiza una incisión longitudinal en la piel de la cabeza, sobre la línea media. Se separa el periostio con la ayuda de unas pinzas, de manera que puedan observarse las cisuras longitudinal y transversal. Con un trepanador se realizan en el cráneo cuatro orificios equidistantes a la intersección de las cisuras. En cada orificio se fija un tornillo que nos servirán de guía para colocar una pieza en forma de horquilla (figura 3-1), que posteriormente recubriremos con un cemento acrílico. El animal se retorna a la jaula y se mantiene en observación hasta que se recupera de la anestesia.



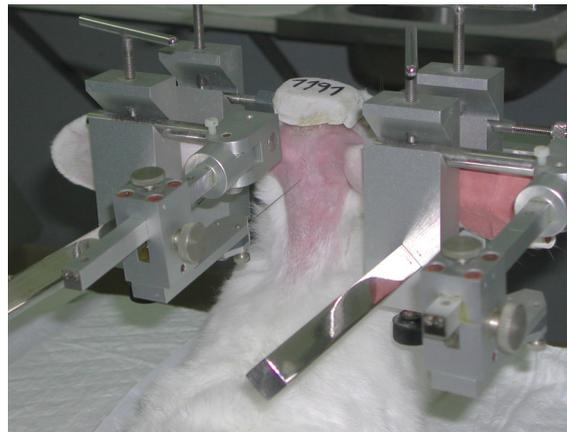
**Figura 3.1.** Colocación de la horquilla en relación a la cabeza del animal

### 3.2.2. Preparación del inóculo e inoculación intracisternal

A partir de una alícuota de la cepa en estudio previamente descongelada, se siembra en una placa de TSA 5% SB, con la ayuda de una torunda estéril, y se deja crecer durante la noche a 37°C. Al día siguiente, se cogen unas cuantas colonias con una asa estéril y se resuspenden en dos tubos de vidrio que contienen 10 ml de Brain Heart Infusión (BHI), haciéndolos incubar en la estufa a 37°C durante 3-4 horas. Una vez transcurrido este tiempo y se aprecie turbidez que indica el crecimiento bacteriano, se procede a llenar dos tubos con suero fisiológico (SF) y cultivo bacteriano a partes iguales, centrifugándolos a 3.000 rpm durante 10 minutos. Se descarta el sobrenadante y al precipitado se le añade SF hasta conseguir una densidad óptica (DO) de 0,5 McFarland (equivalente a una concentración bacteriana de  $\approx 10^8$  ufc/ml). Se hacen diluciones hasta obtener un inóculo con una concentración bacteriana final de  $\approx$

$10^6$  ufc/ml. De este inóculo se realiza un recuento control con diluciones seriadas (1:10) y siembra de las diluciones: -3 ( $10^3$  ufc/ml), -4 ( $10^4$  ufc/ml) y -5 ( $10^5$  ufc/ml) en placas de TSA 5% SB, que se dejan incubar durante 24 para comprobar que el recuento cuantitativo de las colonias sea el correcto.

Una vez tenemos preparado el inóculo bacteriano, volvemos a anestesiarse a los animales con la misma pauta descrita anteriormente. Cuando están completamente dormidos (15-20 minutos) se colocan en el aparato de estereotaxia para proceder a la inoculación intracisternal (figura 3.2). Se desinfecta la zona del cuello, se introduce una aguja de punción lumbar de 25G en la cisterna magna y se extrae una muestra basal de 250  $\mu$ l de LCR (muestra PRE, que nos servirá para comprobar la esterilidad del LCR). A continuación se introducen 250  $\mu$ l de la solución bacteriana con  $\approx 10^6$  ufc/ml y se devuelven los animales a la jaula.

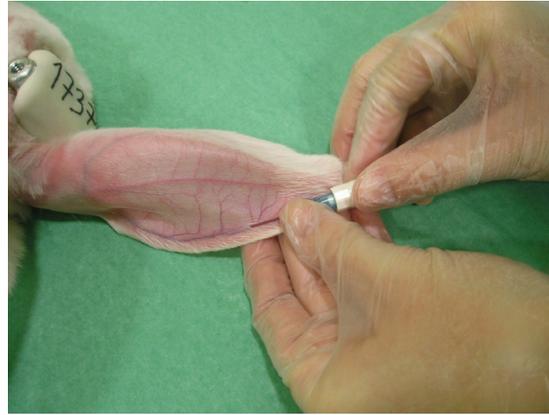


**Figura 3.2.** Animal colocado en el aparato de estereotaxia para punción cisternal

### **3.2.3. Estudio del comportamiento espontáneo de la infección sin tratamiento**

A las 18-20 h después de la inoculación se obtuvieron unos recuentos bacterianos iniciales adecuados ( $\approx 10^4$ - $10^6$  ufc/ml) para los posteriores estudios de eficacia terapéutica. En este momento, día 3<sup>o</sup> del experimento, se procede a anestesiarse de nuevo a los animales con un anestésico de larga duración, uretano al 20% (1,75 g/kg) por vía subcutánea. Al cabo de una hora, cuando los animales están convenientemente dormidos, se le coloca una cánula de

22G en la vena marginal de la oreja (figura 3.3) que nos servirá para administrar el SF o los antibióticos en los experimentos de eficacia terapéutica; también nos será de utilidad por si hemos de complementar la anestesia con tiopental sódico (5 mg/kg).



**Figura 3.3.** Colocación de una cánula en la vena de la oreja

Se extrae una muestra de 0,1 ml de sangre de la arteria de la oreja del animal para realizar un hemocultivo y determinar la bacteriemia secundaria (figura 3.4). A continuación, se coloca de nuevo el animal en el aparato de estereotaxia y se extrae una muestra basal de 0,2 ml de LCR (corresponderá a la hora 0 del experimento) para determinar recuentos bacterianos y parámetros inflamatorios. Inmediatamente se administra 1 ml de SF por vía intravenosa para igualar las condiciones con las del resto de los experimentos. Se realizan extracciones seriadas de 0,2 ml de LCR a las 2, 6 y 24 horas. A las 24 horas se determina la mortalidad, y los animales que sobreviven se sacrifican mediante una sobredosis de tiopental sódico intravenosa, obteniendo después la muestra de LCR de la hora 24.



**Figura 3.4.** Extracción de sangre para realizar hemocultivo

### 3.2.4. Estudios de farmacocinética antibiótica

Antes de iniciar los experimentos terapéuticos se realizaron estudios farmacocinéticos con los antibióticos, con el objetivo de establecer las dosis y el intervalo entre las mismas más adecuadas para alcanzar un perfil farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD) y unos niveles de antibiótico en LCR similares a los que se observan en humanos. Los experimentos de farmacocinética se practicaron en conejos (n=8) inoculados con la cepa de *S. pneumoniae* HUB 2349.

Se obtuvo una muestra de LCR (hora 0) y a continuación se administró vía intravenosa una dosis única del antibiótico correspondiente, ajustada al peso de cada animal. Los puntos horarios de la extracción de sangre (0,2 ml/punto) y LCR (0,1 ml/punto) se describen en la tabla 3.2. Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena safena del animal.

	Extracción sangre (h)	Extracción LCR (h)
<b>Meropenem 150 mg/kg</b>	0'5, 1, 1'5, 2, 4	0'5, 1, 1'5, 2, 4
<b>Rifampicina 15 mg/kg</b>	0'5, 1, 2, 3, 5, 8, 24	1, 2, 3, 5, 8, 24

**Tabla 3.2.** Puntos horarios de extracción de sangre y LCR para los estudios de PK/PD

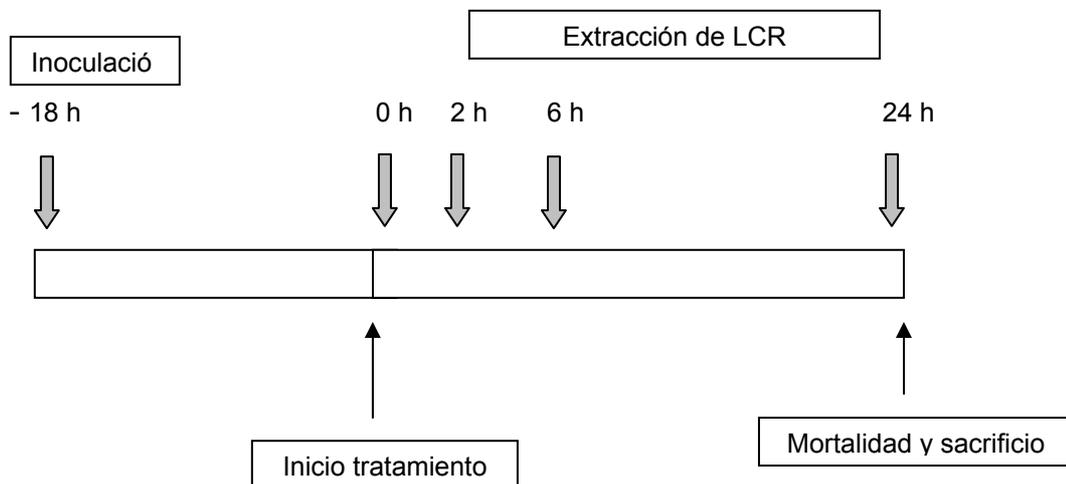
Los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos se calcularon con la ayuda de una aplicación informática (PK Functions for Microsoft Excel. Usansky JI, Desai A and Tang-Liu D. Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan, Irvine, CA 92606, USA) a partir de la concentración del antibiótico en suero y LCR en los diferentes puntos horarios.

Se calcularon los siguientes parámetros farmacocinéticos/ farmacodinámicos:

- ✓ Concentración pico en suero y LCR ( $C_{max}$ )
- ✓ Vida media ( $T_{1/2}$ ; a partir de la constante de eliminación)
- ✓ Área bajo la curva (AUC; a partir de la curva concentración-tiempo)
- ✓ Tiempo en que la concentración de antibiótico en LCR está por encima de la CMI ( $t > MIC$ )
- ✓ Penetración antibiótica como  $AUC_{LCR} / AUC_{suero}$

### 3.2.5. Estudios de eficacia antibiótica

El diseño de los experimentos terapéuticos de la meningitis se muestra en la figura 3.5.



**Figura 3-5.** Esquema del diseño de los experimentos en conejo

A las 18 h después de la inoculación se extrae una muestra de 0,1 ml de sangre para realizar un hemocultivo y determinar la bacteriemia secundaria, y otra de 0,2 ml de LCR que representará la hora 0. En este punto, se asignó aleatoriamente a los conejos a una pauta antibiótica o al grupo control con SF.

Las pautas antibióticas estudiadas en ambas cepas fueron las siguientes:

- ✓ Meropenem 150 mg/kg/6h
- ✓ Rifampicina 15 mg/kg/24h
- ✓ Meropenem 150 mg/kg/6h + Rifampicina 15 mg/kg/24h
- ✓ Control (placebo con SF)

Se realizan extracciones seriadas de 0,2 ml de LCR a las 2, 6 y 24 horas. El tratamiento se prolonga durante 24 horas, transcurridas las cuales se procede a determinar la mortalidad y al sacrificio de los animales que habían sobrevivido, tal como se ha descrito anteriormente.

En cada experimento se trabajó con 5 animales, incluyendo controles y grupos terapéuticos, con un mínimo de dos pautas antibióticas por experimento. Los experimentos se realizaron semanalmente hasta completar el número de animales necesario estadísticamente (mínimo 8 animales por punto horario y pauta terapéutica).

### **Definiciones**

*Efecto bactericida.* Reducción de  $\geq 3$  log ufc/ml respecto al recuento bacteriano obtenido a la hora 0.

*Efecto bacteriostático.* Reducción de  $\pm 1$  log ufc/ml respecto al recuento bacteriano obtenido a la hora 0.

*Fracaso terapéutico.* Incremento de al menos 1 log ufc/ml en la concentración bacteriana en un punto horario respecto al anterior.

*Recrecimiento bacteriano.* Aumento  $< 1$  log ufc/ml en la concentración bacteriana en un punto horario respecto al anterior.

*Desarrollo de resistencia antibiótica.* Cuando el incremento en la concentración bacteriana es consecuencia de un cambio en la CMI, comprobado por E-test.

### **3.3. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS**

Las muestras de LCR y de sangre que no se utilizaban de forma inmediata a su obtención se dejaban reposar unos minutos y se procedía a centrifugarlas a 10.000 g durante 5-10 minutos. A continuación, se guardaban en el congelador a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior procesamiento.

#### **3.3.1. Determinación de bacteriemia secundaria**

La muestra de sangre se cultiva en caldo de TSB a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas, transcurridas las cuales se resiembró 100  $\mu\text{l}$  en placas de TSA-5% SB que se incubaban nuevamente 24 h a  $37^{\circ}\text{C}$ , para determinar la presencia de crecimiento bacteriano y, por tanto, de bacteriemia.

#### **3.3.2. Determinación de recuentos bacterianos**

Una de las muestras de LCR se utilizaba para el recuento de colonias. Se realiza un cultivo directo de 10  $\mu\text{l}$  y diluciones seriadas (1:10) en SF, que se siembran (100  $\mu\text{l}$ ) en placas de TSA-5% SB y se incuban durante 24 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . El límite de detección para el recuento con este método era de  $10^1$  ufc/ml.

#### **3.3.3. Determinación de leucocitos en LCR**

Inmediatamente después de cada extracción de LCR se mezcla en un tubo eppendorf 10  $\mu\text{l}$  del mismo con otros 10  $\mu\text{l}$  de solución *turk* (ácido acético al 10%), para lisar los hematíes de la muestra. Se cogen 10  $\mu\text{l}$  de esta mezcla y se coloca bajo un cubreobjeto en una cámara de Neubauer, procediéndose al recuento de células (leucocitos/ $\mu\text{l}$ ) mediante el microscopio.

#### **3.3.4. Determinación de lactato en LCR**

La concentración de lactato en LCR se efectuó por el método enzimático Lactate PAP (bioMérieux SA, 69280 Marcy l'Etoile, Francia)<sup>185</sup> en el que la muestra problema se pone en contacto con un reactivo enzimático que acaba convirtiendo el lactato en un cromógeno que tiene una absorbancia máxima de 505 nm. Este test enzimático consta de tres reactivos: el reactivo 1 contiene una concentración conocida de lactato y se utiliza para la preparación del

estándar. El reactivo 2 que contiene el tampón buffer y el reactivo 3 que contiene la enzima liofilizada.

Inicialmente se prepara la “solución de trabajo” que consiste en añadir 10 ml del reactivo 2 al reactivo 3, agitando suavemente. A continuación, se prepara la solución estándar, que contiene 1 ml de la solución de trabajo y 10 µl de reactivo 1, cuya función es proporcionar al espectrofotómetro un valor de referencia. Por último, se preparan los tubos con la muestra problema que contienen 1 ml de la solución de trabajo y 10 µl de LCR cuya concentración de lactato queremos determinar.

La lectura de la absorbancia se hace con un espectrofotómetro (DO: 505 nm), primero del patrón estándar de concentración conocida (3 mmol/l) y a continuación de las muestras de LCR. Para calcular los niveles de lactato (mmol/l) se aplica la siguiente fórmula:  $(DO_{\text{muestra}} / DO_{\text{estándar}}) \times 3$ .

### **3.3.5. Determinación de proteínas en LCR**

La concentración de proteínas en LCR se determinó por el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, BioRad Laboratories, München, Alemania)<sup>186</sup> mediante un reactivo (azul brillante de Coomasie) que se une a la proteína produciendo un cambio de color, posteriormente mediremos la absorbancia con un espectrofotómetro (DO: 595 nm).

En primer lugar se prepara un patrón estándar, para lo cual se utiliza cuatro diluciones de albúmina sérica bovina (0,2 a 1,4 mg/ml), con la absorbancia de los valores de albúmina conocidos obteníamos una recta de regresión. A continuación, se introduce en un tubo 20 µl de la muestra de LCR, diluida 1:5 en agua destilada, y 5 ml del reactivo. Se realiza la medición de la absorbancia en el espectrofotómetro a 595 nm, una vez obtenido su valor se lleva a la recta estándar previamente calculada donde se obtiene el valor de la concentración de proteínas de la muestra. Este valor se multiplica por 5 para obtener la concentración real de proteínas, ya que previamente habíamos diluido la muestra 1:5.

### 3.3.6. Determinación de niveles de antibiótico en suero y LCR

La concentración de meropenem y rifampicina en suero y LCR se determinaron mediante la técnica de difusión en agar, bioensayo o método microbiológico<sup>187</sup>, que se basa en el efecto que una determinada dosis de antibiótico tiene sobre una cepa ATCC de sensibilidad conocida o cepa test. Las cepas utilizadas para cada antibiótico se reflejan en la tabla 3-3.

Antibiótico	Cepa test	Límite detección
Meropenem	Bacillus subtilis ATCC 12432	0,12 µg/ml
Rifampicina	Staphylococcus epidermidis ATCC 27626	0,12 µg/ml

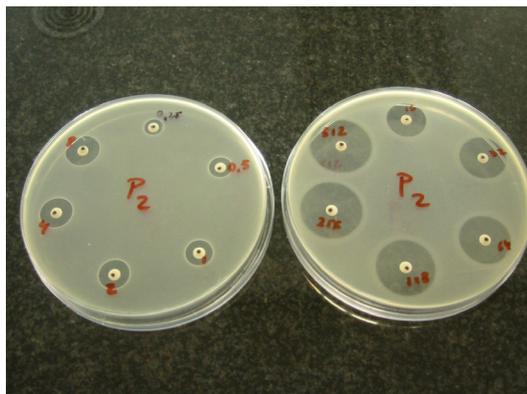
**Tabla 3-3.** Cepas utilizadas para la determinación del nivel de antibiótico

Se prepara un medio de cultivo líquido estéril (Antibiotic Médium No 1 de Difco Labs) y se vierte 17 ml de este medio de cultivo junto a 0,5 ml de una solución con la cepa test en crecimiento exponencial, en diferentes placas. Una vez se ha solidificado el medio, se introducen las placas en la estufa durante una hora a 37°C.

Para cada antibiótico se realiza un banco de diluciones (1:2) con concentraciones conocidas (desde 512 µg/ml hasta 0,12 µg/ml), que nos servirá para efectuar la recta patrón.

Con las placas convenientemente secadas se procede a colocar los discos blancos de forma equidistante en la superficie del agar, que posteriormente impregnaremos con las muestras problema (suero o LCR) o con las muestras del patrón. Para evitar la variabilidad del experimento, se estudia la recta patrón por triplicado y las muestras problema por duplicado, el mismo día.

Después de un periodo de incubación de 4-6 horas a 37°C, se miden los diámetros de los halos de inhibición que cada concentración provoca sobre el crecimiento bacteriano (figura 3-6). Se realiza una recta de regresión o recta patrón a partir de la cual se calculan los niveles de antibiótico en suero y LCR.



**Figura 3-6.** Halos de inhibición en las placas patrón

## **4. Modelo de meningitis en la cobaya**

El modelo de meningitis neumocócica en la cobaya es el desarrollado por Maiques et al<sup>171</sup>, sustancialmente modificado del descrito por Nairm<sup>25</sup>. Del mismo modo que en el modelo de meningitis en el conejo, en una primera etapa se llevaron a cabo una serie de experimentos para ajustar el modelo y estudiar el comportamiento de las cepas de estudio en ausencia de tratamiento. Se estudió la infección meníngea por *S. pneumoniae* en función de diferentes parámetros como: el inóculo bacteriano, los recuentos bacterianos en los diferentes puntos horarios o la supervivencia de los animales, con objeto de ajustar los parámetros para conseguir un modelo útil en los estudios de eficacia terapéutica que se realizarían posteriormente. Antes de los experimentos terapéuticos también se realizaron estudios farmacocinéticos en cobayas infectadas con una de las cepas de neumococo, para seleccionar las dosis de antibiótico más adecuadas.

### **4.1. ANIMALES**

Se utilizaron cobayas Hartley blancas hembras, de 300 a 500 g de peso. Los animales llegaban al estabulario una semana antes de ser utilizados, para permitir su aclimatación y para comprobar que no desarrollaban ninguna patología. Durante este periodo disponían de agua y pienso *ad libitum*.

### **4.2. MODELO EXPERIMENTAL**

La preparación del inóculo bacteriano de las cepas de *S. pneumoniae* se realiza de la misma forma descrita en el apartado 3.2.2, del modelo de meningitis en el conejo.

#### **4.2.1. Inoculación intracisternal**

Los animales se anestesian con una mezcla de ketamina (40 mg/kg) y xilacina (5 mg/kg) vía intramuscular en la nalga. Cuando están dormidos se rasura y desinfecta la zona de la calota y la nuca. A continuación se procede a la inoculación de 0,1 ml de una suspensión de  $10^6$  ufc/ml de la cepa de *S. pneumoniae* correspondiente, por punción directa en la cisterna magna con una

palomita de 27G, sin la ayuda de ningún dispositivo de estereotaxia. Para ello se coloca el animal en hiperflexión forzada de la cabeza, se localiza por tacto la hendidura atlanto-occipital y se introduce la aguja de la palomita en la cisterna magna (figura 3-6). Previamente a la punción se introduce el inóculo en la tubuladora de la palomita y se realiza una marca en el nivel alcanzado por el líquido. Otra persona va aspirando suavemente con una jeringa y cuando fluye el LCR por encima de la marca realizada en la tubuladura, se inyecta lentamente el inóculo y después se retira la aguja. Los animales son devueltos a las jaulas, comprobando que se despiertan sin incidencias.



Figura 3-6. Punción intracisternal en la cobaya

#### **4.2.2. Estudio del comportamiento espontáneo de la infección sin tratamiento**

A las 18-20 h después de la inoculación se obtuvieron unos recuentos bacterianos iniciales adecuados ( $\approx 10^5$ - $10^6$  ufc/ml) para los posteriores estudios de eficacia terapéutica. En este momento, día 2º del experimento, se procede a anestesiarse de nuevo a los animales con la misma pauta descrita y se extrae una muestra basal de 0,15 ml de LCR (que corresponderá a la hora 0 del experimento), para determinar recuentos bacterianos y parámetros inflamatorios. Inmediatamente después se administra 1 ml de SF por vía intramuscular para igualar las condiciones con las del resto de los experimentos. Se realizan extracciones de 0,15 ml de LCR a las 3, 6 y 24 horas. A la hora 24 se determina la mortalidad. Antes de sacrificar a los animales se extrae por punción cardíaca una muestra de 0,2 ml de sangre para

realizar un hemocultivo y por la misma vía se sacrifican, mediante una dosis letal de tiopental sódico.

Debido a su pequeño tamaño no se pueden realizar todas las extracciones de LCR en un mismo animal, por lo que se debieron utilizar diferentes animales para estudiar todos los puntos horarios. Después de realizar algunos experimentos de prueba y comprobar su buena tolerancia, decidimos utilizar una cobaya para estudiar dos puntos horarios, un animal a la hora 0 y 6, y otro diferente para la hora 3 y 24.

#### 4.2.3. Estudios de farmacocinética antibiótica

Antes de iniciar los experimentos terapéuticos se realizaron estudios farmacocinéticos con ambos antibióticos con el objetivo de establecer las dosis y el intervalo entre las mismas más adecuadas para alcanzar un perfil farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD) y unos niveles de antibiótico en LCR similares a los que se observan en humanos. Los experimentos de farmacocinética se practicaron en cobayas inoculadas con la cepa de *S. pneumoniae* HUB 2349. Se utilizaron el número de animales necesario para obtener como mínimo 8 muestras de cada punto horario.

Se obtuvo una muestra de LCR (hora 0) y a continuación se administró vía intravenosa una dosis única del antibiótico correspondiente, ajustada al peso de cada animal. Los puntos horarios de la extracción de sangre (0,2 ml/punto) y LCR (0,1 ml/punto) se describen en la tabla 3.3. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción cardíaca.

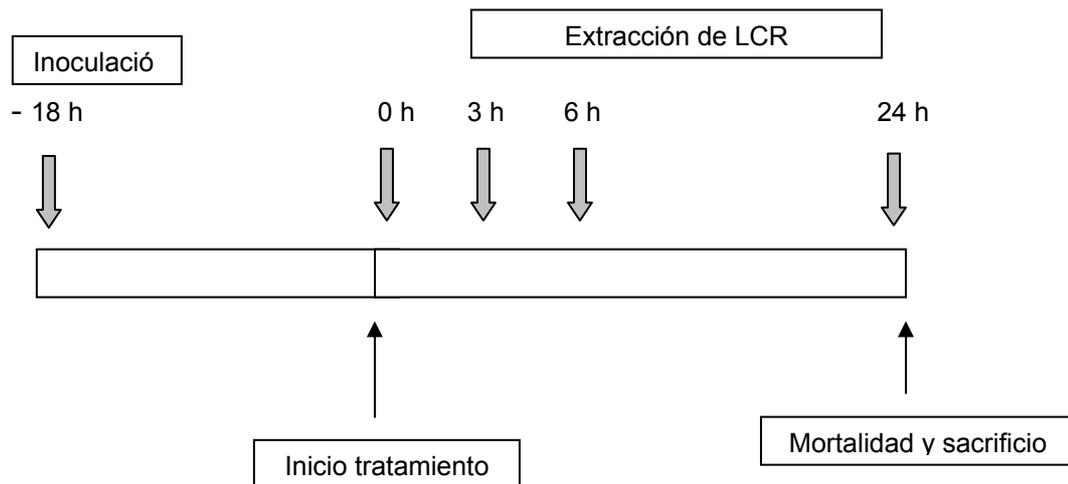
	Extracción sangre (h)	Extracción LCR (h)
<b>Meropenem 200 mg/kg</b>	0'5, 1, 2, 4, 8	1, 2, 4, 8
<b>Rifampicina 30 mg/kg</b>	1, 2, 4, 8, 12, 24	2, 4, 8, 12, 24

**Tabla 3.4.** Puntos horarios de extracción de sangre y LCR para los estudios de PK/PD

Los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos se calcularon tal como se describe en el apartado 3.2.4, del modelo de meningitis en el conejo.

### 3.2.4. Estudios de eficacia antibiótica

El diseño de los experimentos terapéuticos de la meningitis se muestra en la figura 3.7.



**Figura 3-7.** Esquema del diseño de los experimentos en la cobaya

A las 18 h después de la inoculación se extrae una muestra de 0,15 ml de LCR a la hora 0. En este punto, se asignó aleatoriamente a las cobayas a una pauta antibiótica o al grupo control con SF. Las pautas antibióticas estudiadas en ambas cepas fueron las siguientes:

- ✓ Meropenem 200 mg/kg/6h
- ✓ Rifampicina 30 mg/kg/24h
- ✓ Meropenem 200 mg/kg/6h + Rifampicina 30 mg/kg/24h
- ✓ Control (placebo con SF)

Se realizaron extracciones seriadas de 0,15 ml de LCR a las 3, 6 y 24 horas. El tratamiento se prolongó durante 24 horas, transcurridas las cuales se procedió a determinar la mortalidad y al sacrificio de los animales que habían sobrevivido, tal como se ha descrito anteriormente.

En cada experimento se trabajó con 8 animales, incluyendo controles y grupos terapéuticos, con un mínimo de dos pautas antibióticas por experimento. Los experimentos se realizaron semanalmente hasta completar el número de animales necesario estadísticamente (mínimo 8 animales por punto horario y pauta terapéutica).

#### **4.3. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS**

El procesamiento de las muestras obtenidas de la cobaya se efectuó tal como se ha descrito en el apartado 3.3 del modelo de meningitis en el conejo.

## **5. Análisis estadístico**

El procesamiento de los datos se realizó con la aplicación estadística SPSS 14.0. Los datos se expresan en forma de media  $\pm$  desviación estándar.

Se comprobó que los datos relativos a los recuentos bacterianos y a los parámetros inflamatorios seguían una distribución normal mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se utilizó el Análisis de la Varianza (ANOVA) con el test de Scheffe's como prueba *post hoc*, para la comparación de los diferentes grupos terapéuticos, y la t de Student para la comparación de ambas cepas. En todas las pruebas se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$ .



## IV. Resultados



## **1. Estudiar la actividad *in vitro* de los antibióticos en solitario y en combinación frente a las cepas objeto de estudio**

### **1.1. CURVAS DE LETALIDAD CEPA HUB SIII**

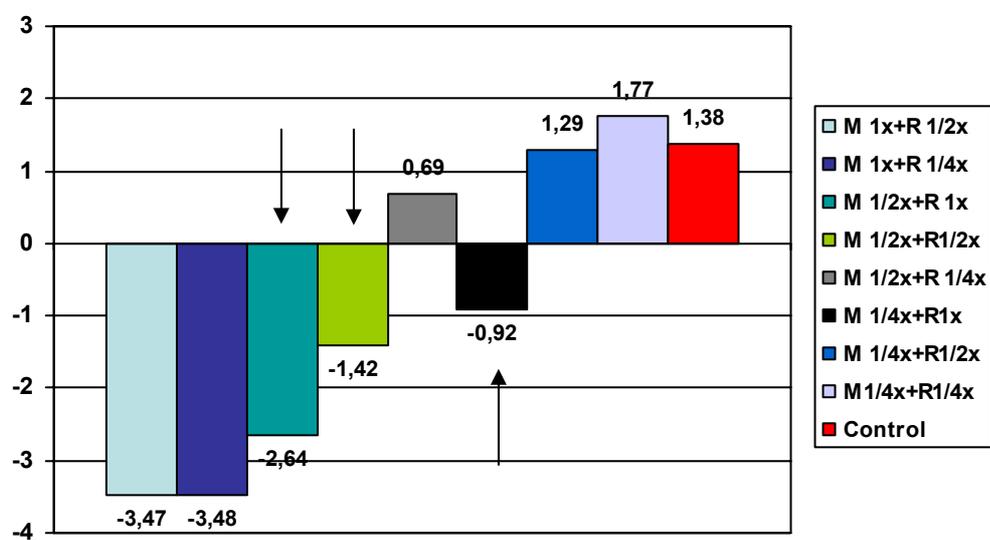
Los resultados de las curvas de letalidad para la cepa HUB SIII se muestran en la tabla 4-1 y la figura 4-1. Meropenem a concentraciones 2-32xCMI es bactericida a partir de las 6 horas, mientras que rifampicina a concentraciones 2-32xCMI es bacteriostática a las 6 horas. De las combinaciones estudiadas MPN1/2x + RIF1xCMI, MPN1/2x + RIF1/2xCMI y MPN1/4x + RIF1xCMI son sinérgicas a las 6 horas y el resto presentan indiferencia. A las 24 horas se detectaron mutantes resistentes en todas las curvas que incluyeron rifampicina en solitario y en combinación con meropenem.

	$\Delta \log \text{ ufc/ml}$ 6h	$\Delta \log \text{ ufc/ml}$ 24h		$\Delta \log \text{ ufc/ml}$ 6h	$\Delta \log \text{ ufc/ml}$ 24h
<b>Control</b>	+ 1,38	+1,03			
<b>RIF 32x</b>	-1,06	+2,19	<b>MPN 32x</b>	-4,57	-4,88
<b>RIF 16x</b>	-0,80	+2,14	<b>MPN 16x</b>	-4,53	-4,88
<b>RIF 8x</b>	-0,60	+2,12	<b>MPN 8x</b>	-4,57	-4,88
<b>RIF 4x</b>	-0,56	+1,86	<b>MPN 4x</b>	-4,72	-4,88
<b>RIF 2x</b>	-0,34	+1,82	<b>MPN 2x</b>	-4,53	-4,88
<b>RIF 1x</b>	+1,10	+1,34	<b>MPN 1x</b>	-4,64	+1,51
<b>RIF 1/2x</b>	+1,47	+1,86	<b>MPN 1/2x</b>	+0,83	+0,97
<b>RIF 1/4x</b>	+1,81	+1,82	<b>MPN 1/4x</b>	+1,37	+0,76

	$\Delta \log \text{ ufc/ml}$ 6h	$\Delta \log \text{ ufc/ml}$ 24h
<b>M 1x + R 1x</b>	-2,94	-4,88
<b>M 1x + R 1/2x</b>	-3,47 <sup>I</sup>	-2,39
<b>M 1x + R 1/4x</b>	-3,48 <sup>I</sup>	+0,83
<b>M 1/2x + R 1x</b>	-2,64 <sup>S</sup>	+1,49
<b>M 1/2x + R 1/2x</b>	-1,42 <sup>S</sup>	+1,30
<b>M 1/2x + R 1/4x</b>	+0,69 <sup>I</sup>	+0,60
<b>M 1/4x + R 1x</b>	-0,92 <sup>S</sup>	+1,24
<b>M 1/4x + R 1/2x</b>	+1,29 <sup>I</sup>	+1,27
<b>M 1/4x + R 1/4x</b>	+1,77 <sup>I</sup>	+1,32

I: Indiferencia  
S: Sinergia

**Tabla 4-1.**  $\Delta$  logaritmos ufc/ml en los antibióticos en solitario y en combinación. Cepa HUB SIII



Sinergia →

**Figura 4-1.** Δ logaritmos ufc/ml en las combinaciones de meropenem y rifampicina a las 6 horas

## 1. 2. CURVAS DE LETALIDAD CEPA HUB 2349

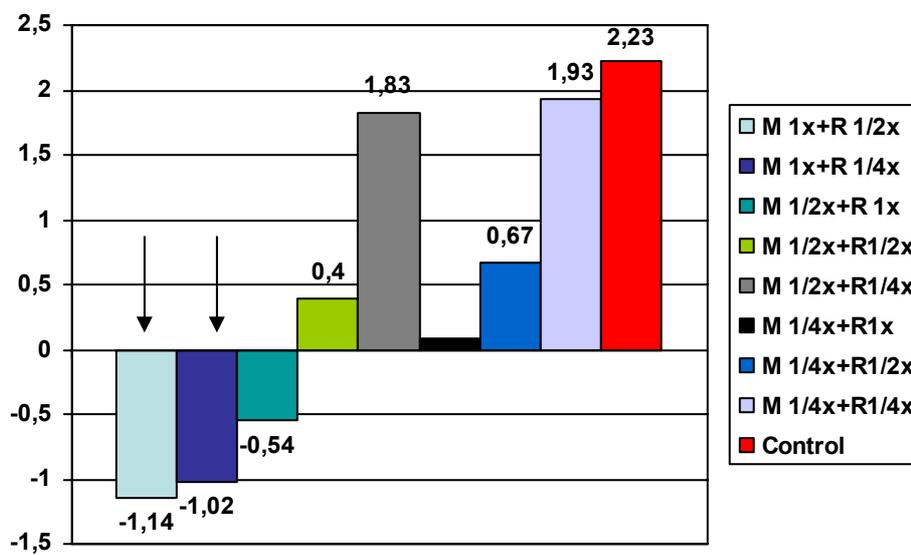
Los resultados de las curvas de letalidad para la cepa HUB 2349 se muestran en la tabla 4-2 y la figura 4-2. Meropenem a concentraciones 2-4 x MIC mostró efecto bactericida a las 6 horas, mientras que rifampicina a concentraciones por encima de la MIC fue bacteriostática. De las combinaciones estudiadas, MPN1x + RIF1/2xCMI y MPN1x + RIF1/4xCMI fueron sinérgicas a las 6 horas y el resto presentaron indiferencia. A las 24 horas se detectaron resistencias en todas las curvas que incluyeron rifampicina en solitario y en combinación con meropenem.

	$\Delta \log \text{ ufc/ml}$ 6h	$\Delta \log \text{ ufc/ml}$ 24h		$\Delta \log \text{ ufc/ml}$ 6h	$\Delta \log \text{ ufc/ml}$ 24h
<b>Control</b>	+ 2,23	+1.30			
<b>RIF 8x</b>	-0,15	+2,35	<b>MPN 4x</b>	-3,96	-4,89
<b>RIF 4x</b>	-0,02	+2,88	<b>MPN 2x</b>	-3,85	+0,90
<b>RIF 2x</b>	-0,23	+2,70	<b>MPN 1x</b>	+1,03	+0,71
<b>RIF 1x</b>	-0,09	+2,64	<b>MPN 1/2x</b>	+2,17	+1,56
<b>RIF 1/2x</b>	+1,39	+1,96	<b>MPN 1/4x</b>	+1,25	+1,98
<b>RIF 1/4x</b>	+2,05	+2,08			

	$\Delta \log \text{ ufc/ml}$ 6h	$\Delta \log \text{ ufc/ml}$ 24h
<b>MPN 1x + RIF 1x</b>	-0,63	+2,19
<b>MPN 1x + RIF 1/2x</b>	-1,14 <sup>S</sup>	+2,57
<b>MPN 1x + RIF 1/4x</b>	-1,02 <sup>S</sup>	+2,15
<b>MPN 1/2x + RIF 1x</b>	-0,54 <sup>I</sup>	+2,64
<b>MPN 1/2x + RIF 1/2x</b>	+0,40 <sup>I</sup>	+2,46
<b>MPN 1/2x + RIF 1/4x</b>	+1,83 <sup>I</sup>	+1,93
<b>MPN 1/4x + RIF 1x</b>	+0,09 <sup>I</sup>	+2,47
<b>MPN 1/4x + RIF 1/2x</b>	+0,67 <sup>I</sup>	+2,18
<b>MPN 1/4x + RIF 1/4x</b>	+1,93 <sup>I</sup>	+2,06

I: Indiferencia  
S: Sinergia

**Tabla 4-2.**  $\Delta$  logaritmos ufc/ml en los antibióticos en solitario y en combinación. Cepa HUB 2349

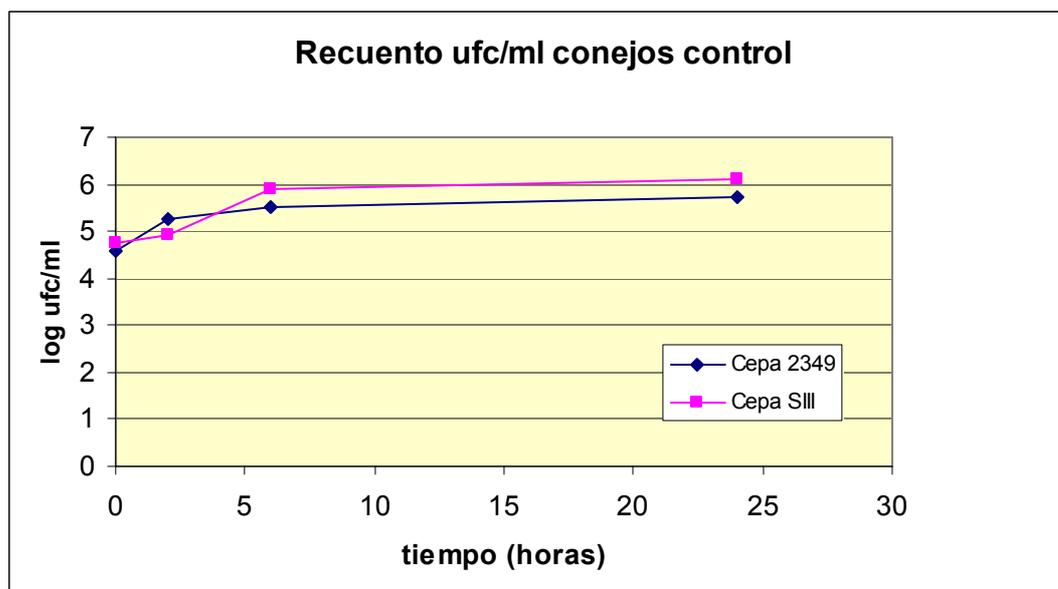


Sinergia →

**Figura 4-2.** Δ logaritmos ufc/ml en las combinaciones de meropenem y rifampicina a las 6 horas.

## **2. Determinar la capacidad de generar meningitis de dos cepas de *S. pneumoniae* en el modelo experimental en conejo**

A las 18 h después de la inoculación ( $10^6$  ufc/ml), ambas cepas fueron capaces de inducir meningitis, obteniéndose unos recuentos bacterianos iniciales adecuados ( $\approx 10^4$ - $10^6$  ufc/ml) para los posteriores estudios de eficacia terapéutica. Estos recuentos se mantuvieron elevados durante las 24 horas que duraba el experimento (figura 4-3), lo que garantizaba la comparación con controles sin tratamiento en todos los experimentos terapéuticos.



**Figura 4-3.** Recuentos bacterianos en los animales control con ambas cepas

**Supervivencia.** Sin tratamiento se produce la muerte en el 62% de los animales inoculados con la cepa HUB 2349 y en el 63% de los animales inoculados con la cepa HUB SIII.

**Bacteriemia.** Todos los animales inoculados con la cepa HUB 2349 tenían el hemocultivo positivo a la hora 0, mientras que sólo lo presentaban el 76% de los inoculados con la cepa HUB SIII.

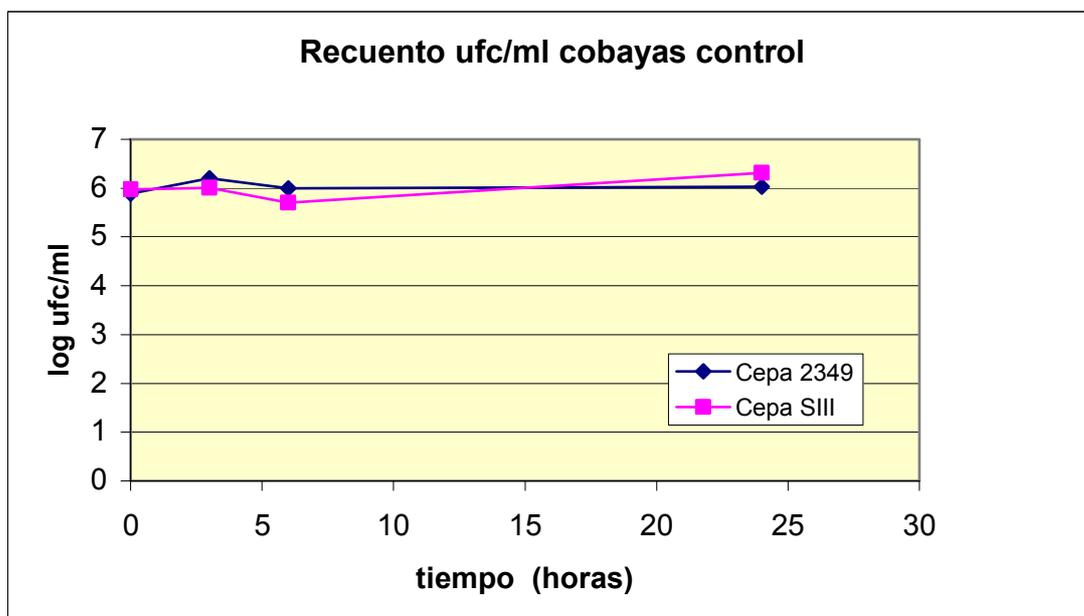
Los valores de leucocitos/ $\mu\text{l}$  en LCR, en cada muestra horaria, para las dos cepas se resumen en la tabla 4-3.

		<i>Hora 0</i>	<i>Hora 2</i>	<i>Hora 6</i>	<i>Hora 24</i>
<b>Cepa 2349</b>	<b>Leucos (cél/<math>\mu\text{l}</math>)</b>	8843 $\pm$ 7612	6484 $\pm$ 4902	5160 $\pm$ 2200	2113 $\pm$ 776
<b>Cepa SIII</b>	<b>Leucos (cél/<math>\mu\text{l}</math>)</b>	3877 $\pm$ 4100	2978 $\pm$ 1993	1638 $\pm$ 1333	1801 $\pm$ 1332

**Tabla 4-3.** Valores de leucocitos en LCR en el conejo

### **3. Determinar la capacidad de generar meningitis de dos cepas de *S. pneumoniae* en el modelo experimental en cobaya**

A las 18 h después de la inoculación ( $10^6$  ufc/ml), ambas cepas fueron capaces de inducir meningitis, obteniéndose unos recuentos bacterianos iniciales adecuados ( $\approx 10^4$ - $10^6$  ufc/ml) para los posteriores estudios de eficacia terapéutica. Estos recuentos se mantuvieron elevados durante las 24 horas que duraba el experimento (figura 4-4), lo que garantizaba la comparación con controles sin tratamiento en todos los experimentos terapéuticos.



**Figura 4-4.** Recuentos bacterianos en los animales control con ambas cepas

**Supervivencia.** Sin tratamiento se produce la muerte en el 44% de los animales inoculados con la cepa HUB SIII, mientras que con la cepa HUB 2349 todos los animales sobreviven.

**Bacteriemia.** Todas las cobayas inoculadas con ambas cepas tenían los hemocultivos positivos a las 0 horas.

Los valores de leucocitos/ $\mu\text{l}$  en LCR, en cada muestra horaria, para las dos cepas se resumen en la tabla 4-4.

		<i>Hora 0</i>	<i>Hora 3</i>	<i>Hora 6</i>	<i>Hora 24</i>
<b>Cepa 2349</b>	<b>Leucos (cél/<math>\mu\text{l}</math>)</b>	3094 $\pm$ 1647	3223 $\pm$ 2640	5715 $\pm$ 4049	4196 $\pm$ 2891
<b>Cepa SIII</b>	<b>Leucos (cél/<math>\mu\text{l}</math>)</b>	2260 $\pm$ 727	3603 $\pm$ 892	3395 $\pm$ 2693	1950 $\pm$ 240

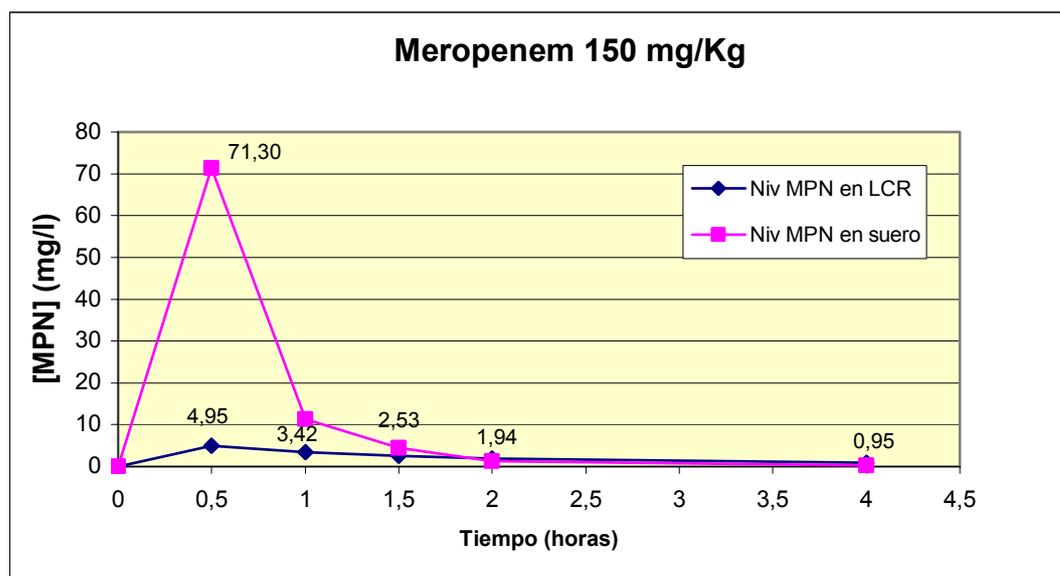
**Tabla 4-4.** Valores de leucocitos en LCR en la cobaya

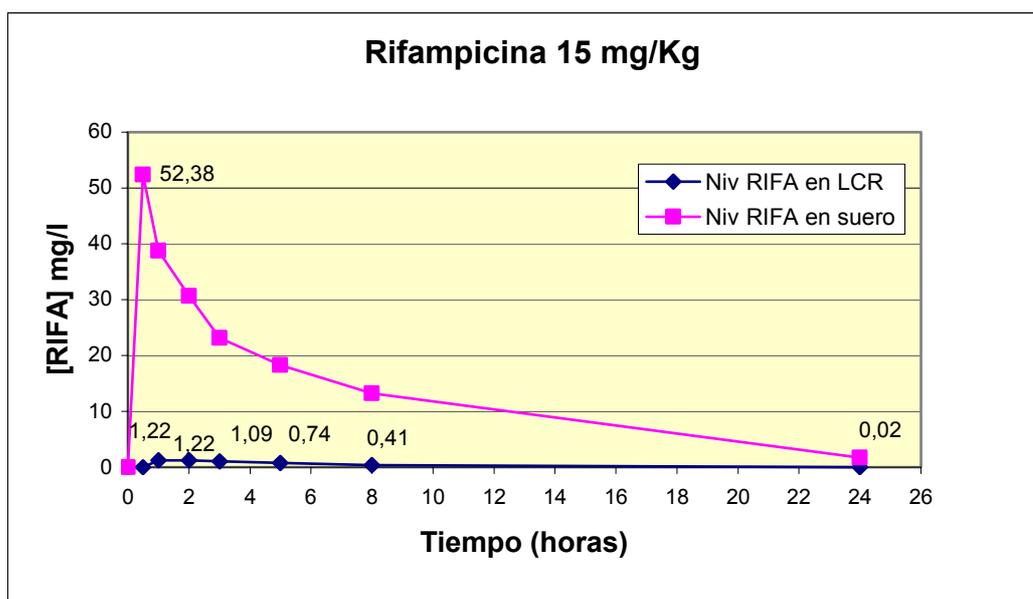
#### **4. Establecer y ajustar los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos en LCR de los antibióticos utilizados**

Los estudios de farmacocinética de ambos modelos animales de meningitis se realizaron con la cepa HUB 2349, después de la administración de una única dosis del antibiótico a estudiar.

##### **4.1. FARMACOCINÉTICA EN EL CONEJO**

La curva de concentración-tiempo para cada antibiótico en suero y LCR se muestra en la figura 4-5. La figura incluye la concentración máxima alcanzada en suero y los niveles de antibiótico en LCR en cada punto horario.





**Figura 4-5.** Curva concentración-tiempo para meropenem y rifampicina en el conejo

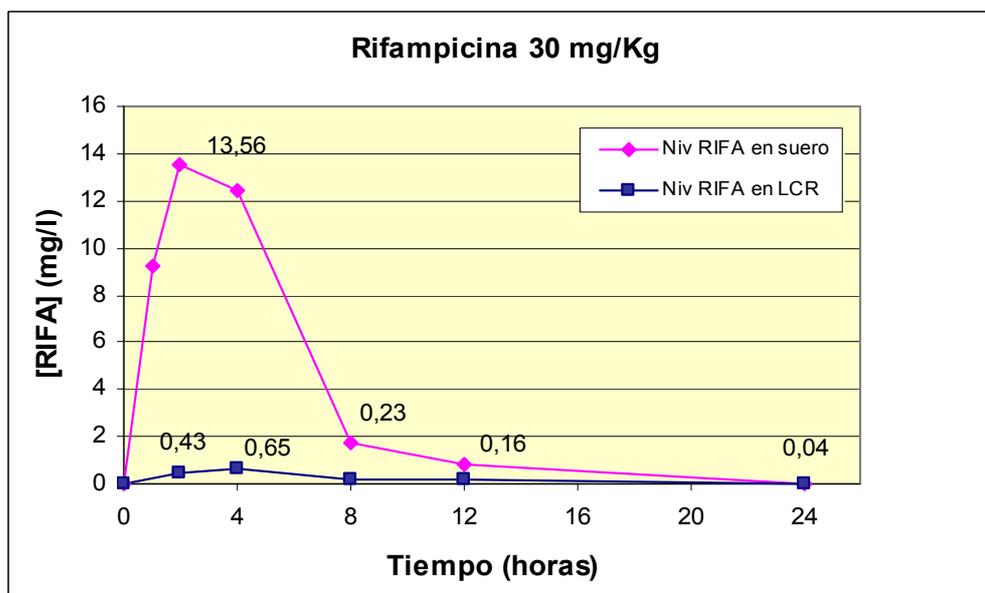
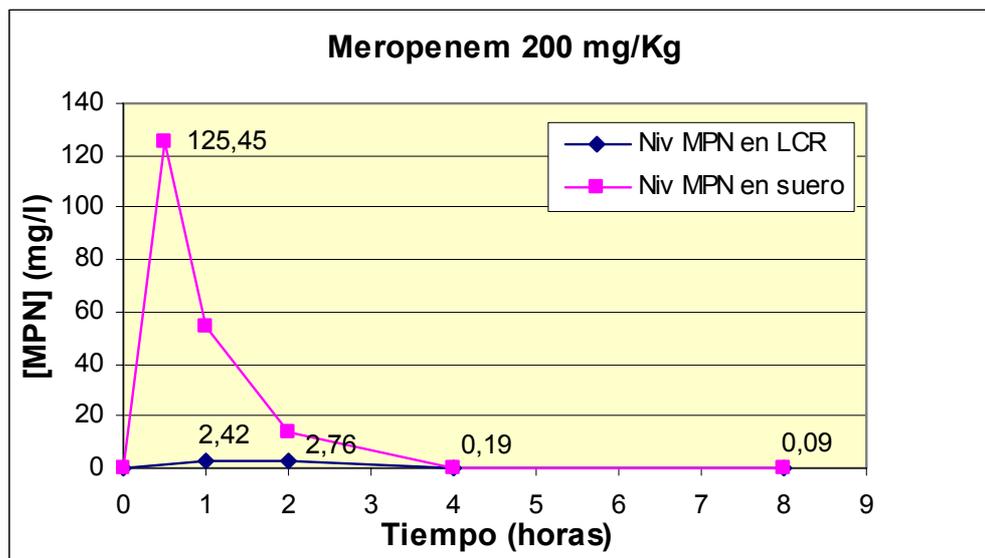
Los parámetros FK/FD de los antibióticos utilizados en la meningitis en el conejo se encuentran reflejados en la tabla 4-5.

	T1/2 (h) Suero LCR	Penetración (%)	AUC <sub>CSF</sub> (µg/h/ml)	t > CMI h (%)
<b>MPN</b>	0,48 / 1,52	19,4	8,82	5,17 (86)
<b>RIF</b>	5,10 / 8,58	3,7	11,44	36,54 (>100)

**Tabla 4.5.** Parámetros FK/FD de los antibióticos en la meningitis en el conejo

#### 4. 2. FARMACOCINÉTICA EN LA COBAYA

La curva de concentración-tiempo para cada antibiótico en suero y LCR se muestra en la figura 4-6. La figura incluye la concentración máxima alcanzada en suero y los niveles de antibiótico en LCR en cada punto horario.



**Figura 4-6.** Curva concentración-tiempo para meropenem y rifampicina en la cobaya

Los parámetros FK/FD de los antibióticos utilizados en la meningitis en la cobaya se encuentran reflejados en la tabla 4-6.

	<b>T1/2 (h) Suero LCR</b>	<b>Penetración (%)</b>	<b>AUC<sub>CSF</sub> (µg/h/ml)</b>	<b>t &gt; CMI h (%)</b>
<b>MPN</b>	0,65 / 1,33	5,8	7,30	4,02 (67)
<b>RIF</b>	2,38 / 5,68	6,5	5,18	20,11(83)

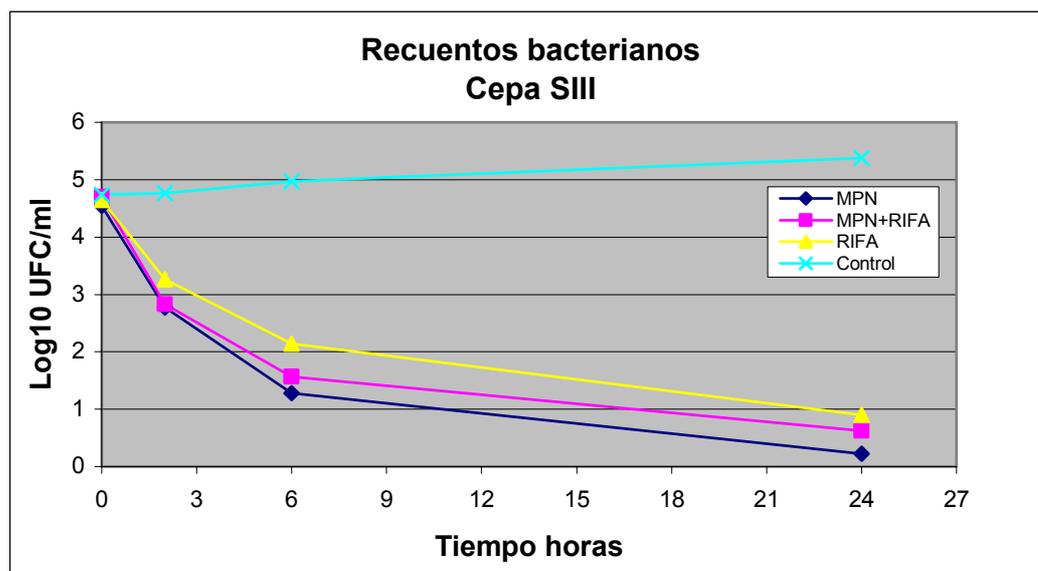
**Tabla 4.6.** Parámetros FK/FD de los antibióticos en la meningitis en la cobaya

## **5. Evaluar la eficacia terapéutica y la respuesta inflamatoria de meropenem y rifampicina en el modelo de meningitis en el conejo**

### **5.1. EFICACIA TERAPÉUTICA CEPA HUB SIII**

A las 18 horas de la inoculación el 76% de los animales presentan el hemocultivo positivo para *S. pneumoniae*. La mortalidad fue del 63% (7/11) en el grupo control y no se produjo ninguna muerte en los animales tratados.

La concentración bacteriana inicial en el LCR y los decrecimientos bacterianos a las 2, 6 y 24 horas se encuentran reflejados en la figura 4-7 y en la tabla 4-7.



**Figura 4-7.** Recuentos bacterianos en LCR de los conejos inoculados con la cepa HUB SIII

No se produjeron fracasos terapéuticos ni recrecimientos bacterianos con ningún grupo terapéutico. Meropenem en solitario y en combinación es bactericida desde las 6 horas, la adición de rifampicina al meropenem no aumenta la eficacia del antibiótico en solitario. La rifampicina es bactericida a las 24 horas.

Tratamiento	Log ufc/ml 0h media±DE	Δlog ufc/ml 2h media	Δlog ufc/ml 6h media	Δlog ufc/ml 24h media
<b>Control</b>	4,74 ± 0,29	+ 0,03	+ 0,18	+ 0,59
<b>Meropenem</b>	4,54 ± 0,47	- 1,77*	- 3,27*	- 4,32*
<b>Rifampicina</b>	4,64 ± 0,61	- 1,38*	- 2,50*	- 3,74*
<b>MRP+RIF</b>	4,70 ± 0,25	- 1,87*	- 3,13*	- 4,08*

\* vs control p=0,000

**Tabla 4-7.** Variaciones en los recuentos bacterianos del LCR. Cepa HUB SIII

## 5. 2. RESPUESTA INFLAMATORIA CEPA HUB SIII

Los valores de lactato, proteínas y leucocitos en LCR en los diferentes puntos horarios y con los distintos tratamientos se pueden observar en la tabla 4-8. La combinación de meropenem y rifampicina provoca mayor aumento de los parámetros inflamatorios que los tratamientos en solitario, aunque este incremento en los valores no alcanza significación estadística.

	Tratamiento	Leucocitos (cél/ $\mu$ l)	Lactato mmol/l	Proteínas g/l
<b>Hora 0</b>	<b>Meropenem</b>	2287 $\pm$ 1597	3,75 $\pm$ 1,28	1,00 $\pm$ 0,39
	<b>Rifampicina</b>	2673 $\pm$ 2406	3,18 $\pm$ 1,22	1,27 $\pm$ 0,83
	<b>MPN + RIF</b>	5324 $\pm$ 4268	4,39 $\pm$ 1,11	1,86 $\pm$ 1,07
	<b>Control</b>	3877 $\pm$ 4100	3,82 $\pm$ 1,25	1,45 $\pm$ 0,70
<b>Hora 2</b>	<b>Meropenem</b>	1520 $\pm$ 758	3,54 $\pm$ 1,33	1,35 $\pm$ 0,48
	<b>Rifampicina</b>	2144 $\pm$ 1724	3,17 $\pm$ 0,79	1,71 $\pm$ 0,60
	<b>MPN + RIF</b>	4046 $\pm$ 5055	3,79 $\pm$ 0,92	2,04 $\pm$ 0,83
	<b>Control</b>	2978 $\pm$ 1993	3,52 $\pm$ 1,08	1,66 $\pm$ 0,68
<b>Hora 6</b>	<b>Meropenem</b>	2223 $\pm$ 1115	3,24 $\pm$ 1,35	1,52 $\pm$ 0,37
	<b>Rifampicina</b>	1458 $\pm$ 1013	2,82 $\pm$ 0,82	1,61 $\pm$ 0,58
	<b>MPN + RIF</b>	3859 $\pm$ 4446	3,49 $\pm$ 0,80	2,00 $\pm$ 0,49
	<b>Control</b>	1638 $\pm$ 1333	3,20 $\pm$ 0,89	2,05 $\pm$ 0,91
<b>Hora 24</b>	<b>Meropenem</b>	1321 $\pm$ 689	1,95 $\pm$ 0,93	1,53 $\pm$ 0,56
	<b>Rifampicina</b>	1535 $\pm$ 738	2,33 $\pm$ 1,44	1,56 $\pm$ 0,49
	<b>MPN + RIF</b>	2545 $\pm$ 2442	2,18 $\pm$ 0,79	2,07 $\pm$ 0,64
	<b>Control</b>	1801 $\pm$ 1332	3,62 $\pm$ 0,87	2,08 $\pm$ 0,74

**Tabla 4-8.** Parámetros inflamatorios. Cepa HUB SIII

### 5. 3. EFICACIA TERAPÉUTICA CEPA HUB 2349

A las 18 horas de la inoculación el 100% de los animales presentan el hemocultivo positivo para *S. pneumoniae*. La mortalidad a las 24 horas fue del 62% (5/8) en el grupo control y no se produjo ninguna muerte en los animales tratados.

La concentración bacteriana inicial en el LCR y los decrecimientos bacterianos a las 2, 6 y 24 horas se encuentran reflejados en la figura 4-8 y la tabla 4-9. A las 6 horas de tratamiento con MPN se observó fracaso terapéutico en 3/8 conejos y recrecimiento en otros 3, mientras que con los otros grupos terapéuticos no se produjo ningún fracaso terapéutico ni recrecimiento. A las 6 horas la combinación de meropenem y rifampicina mejora la eficacia del antibiótico en solitario, haciéndola bactericida. A las 24 horas todos los tratamientos son bactericidas.

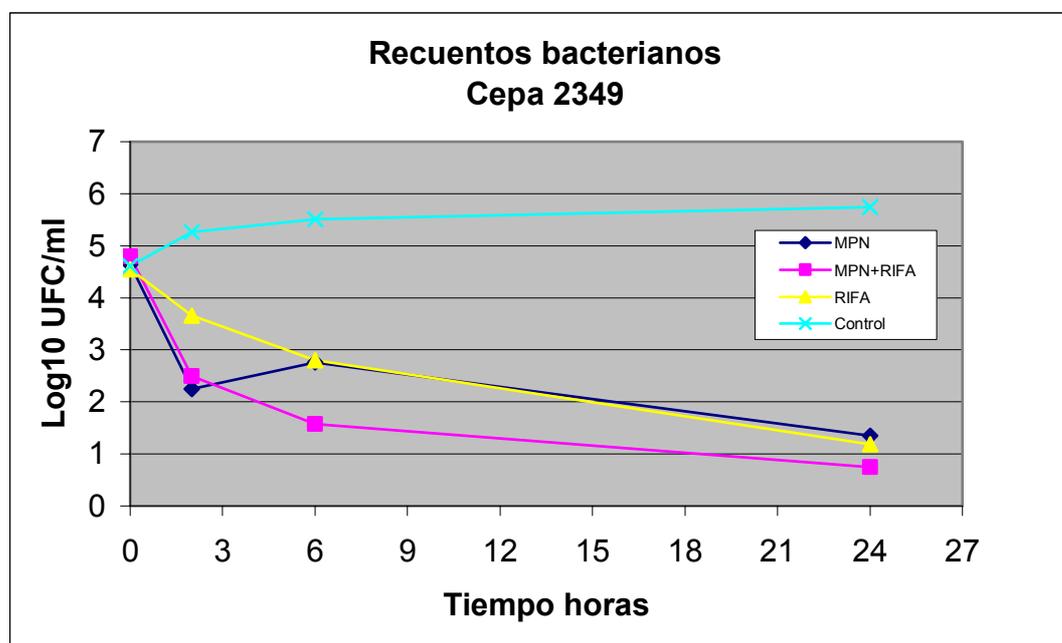


Figura 4-8. Recuentos bacterianos en LCR de los conejos inoculados con la cepa HUB 2349

Tratamiento	Log ufc/ml 0h media±DE	Δlog ufc/ml 2h media	Δlog ufc/ml 6h media	Δlog ufc/ml 24h media
<b>Control</b>	4,60 ± 0,7	+ 0,98	+ 1,43	+ 0,74
<b>Meropenem</b>	4,64 ± 0,51	- 2,39 *	- 1,95 *	- 3,36 *
<b>Rifampicina</b>	4,54 ± 0,67	- 0,88 *	- 1,74 *	- 3,36 *
<b>MRP+RIF</b>	4,79 ± 0,66	- 2,29 *	- 3,21 * #	- 3,88 *

\* vs control p<0,006

# vs M y R p<0,05

**Tabla 4-9.** Variaciones en los recuentos bacterianos del LCR. Cepa HUB 2349

#### 5. 4. RESPUESTA INFLAMATORIA CEPA HUB 2349

Los valores de lactato, proteínas y leucocitos en LCR en los diferentes puntos horarios y con los distintos tratamientos se pueden observar en la tabla 4-10. La combinación de meropenem y rifampicina provoca mayor incremento de los parámetros inflamatorios que los tratamientos en solitario, pero este aumento sólo alcanza significación estadística para el lactato a las 24 horas en relación al grupo tratado con rifampicina.

	Tratamiento	Leucocitos (cél/ $\mu$ l)	Lactato mmol/l	Proteínas g/l
<b>Hora 0</b>	<b>Meropenem</b>	6120 $\pm$ 4347	6,21 $\pm$ 0,67	1,61 $\pm$ 0,60
	<b>Rifampicina</b>	4722 $\pm$ 4822	7,02 $\pm$ 1,88	0,98 $\pm$ 0,49
	<b>MPN + RIF</b>	11004 $\pm$ 8051	7,06 $\pm$ 1,25	2,49 $\pm$ 0,86
	<b>Control</b>	8843 $\pm$ 7612	6,33 $\pm$ 1,88	2,05 $\pm$ 0,76
<b>Hora 2</b>	<b>Meropenem</b>	5565 $\pm$ 4728	5,01 $\pm$ 0,41	2,34 $\pm$ 0,45
	<b>Rifampicina</b>	6413 $\pm$ 9879	6,58 $\pm$ 1,71	1,30 $\pm$ 0,43
	<b>MPN + RIF</b>	11753 $\pm$ 8884	7,00 $\pm$ 1,75	3,18 $\pm$ 1,08
	<b>Control</b>	6484 $\pm$ 4902	5,37 $\pm$ 1,46	2,24 $\pm$ 0,75
<b>Hora 6</b>	<b>Meropenem</b>	4457 $\pm$ 2205	4,14 $\pm$ 0,71	2,11 $\pm$ 0,73
	<b>Rifampicina</b>	4446 $\pm$ 6234	5,82 $\pm$ 1,62	1,43 $\pm$ 0,52
	<b>MPN + RIF</b>	8222 $\pm$ 9673	5,39 $\pm$ 1,75	3,00 $\pm$ 0,98
	<b>Control</b>	5160 $\pm$ 2200	5,35 $\pm$ 1,30	2,47 $\pm$ 0,91
<b>Hora 24</b>	<b>Meropenem</b>	3041 $\pm$ 1001	4,02 $\pm$ 1,49	2,47 $\pm$ 0,98
	<b>Rifampicina</b>	1792 $\pm$ 1145	3,14 $\pm$ 0,60	1,27 $\pm$ 0,56
	<b>MPN + RIF</b>	3066 $\pm$ 2337	5,96 $\pm$ 2,10 *	3,11 $\pm$ 0,71
	<b>Control</b>	2113 $\pm$ 776	3,59 $\pm$ 0,85	2,05 $\pm$ 0,81

\*  $p < 0,01$  vs grupo RIFA

**Tabla 4-10.** Parámetros inflamatorios. Cepa HUB 2349

### 5. 5. NIVELES DE ANTIBIÓTICO EN EL LCR DEL CONEJO

Los niveles de meropenem y rifampicina obtenidos en el LCR del conejo con ambas cepas se reflejan en la tabla 4-11.

		Hora 2 [mg/l]	Hora 6 [mg/l]	Hora 24 [mg/l]
<b>Cepa HUB 2349</b>	<b>Meropenem</b>	1,20 ± 0,34	0,19 ± 0,14	0,15 ± 0,12
	<b>Rifampicina</b>	1,19 ± 0,41	---	0,61 ± 0,27
<b>Cepa HUB SIII</b>	<b>Meropenem</b>	1,52 ± 0,81	0,43 ± 0,35	0,24 ± 0,10
	<b>Rifampicina</b>	0,88 ± 0,33	0,45 ± 0,25	0,05 ± 0,02

**Tabla 4-11.** Niveles de antibiótico en LCR del conejo

## **6. Comparación de los resultados de la meningitis en el conejo con ambas cepas**

Con la cepa sensible, meropenem es más eficaz a las 6 ( $p=0,006$ ) y 24 horas ( $p=0,007$ ), siendo bactericida desde las 6 horas y no observándose fracaso terapéutico ni recrecimiento en ningún animal, mientras que con la cepa resistente, a las 6 horas se aprecia fracaso terapéutico en 3/8 conejos y recrecimiento en otros 3, aunque a las 24 horas también es bactericida.

Los valores de los parámetros inflamatorios: leucocitos, lactato y proteínas en LCR, están más elevados con todos los tratamientos y en casi todos los puntos horarios con la cepa HUB 2349, pero sólo en algunos puntos horarios se observa este incremento de forma significativa (tablas 4-12, 4-13 y 4-14).

Todos los animales inoculados con la cepa resistente tienen el hemocultivo positivo a la hora 0, mientras que sólo desarrollan bacteriemia el 76% de los inoculados con la cepa HUB SIII.

Sin tratamiento se produce la muerte en el 62% de los animales inoculados con la cepa HUB 2349 (5/8) y en el 63% de los animales inoculados con la cepa HUB SIII (7/11). No se produce ninguna muerte en los animales a los que se les ha administrado tratamiento antibiótico, sea cual sea la cepa con la que hayan sido infectados.

	Tratamiento	Cepa HUB SIII Leucocitos (cél/ $\mu$ l)	Cepa HUB 2349 Leucocitos (cél/ $\mu$ l)
<b>Hora 0</b>	<b>Meropenem</b>	2287 $\pm$ 1597	6120 $\pm$ 4347*
	<b>Rifampicina</b>	2673 $\pm$ 2406	4722 $\pm$ 4822
	<b>MPN + RIF</b>	5324 $\pm$ 4268	11004 $\pm$ 8051
	<b>Control</b>	3877 $\pm$ 4100	8843 $\pm$ 7612
<b>Hora 2</b>	<b>Meropenem</b>	1520 $\pm$ 758	5565 $\pm$ 4728*
	<b>Rifampicina</b>	2144 $\pm$ 1724	6413 $\pm$ 9879
	<b>MPN + RIF</b>	4046 $\pm$ 5055	11753 $\pm$ 8884*
	<b>Control</b>	2978 $\pm$ 1993	6484 $\pm$ 4902
<b>Hora 6</b>	<b>Meropenem</b>	2223 $\pm$ 1115	4457 $\pm$ 2205*
	<b>Rifampicina</b>	1458 $\pm$ 1013	4446 $\pm$ 6234
	<b>MPN + RIF</b>	3859 $\pm$ 4446	8222 $\pm$ 9673
	<b>Control</b>	1638 $\pm$ 1333	5160 $\pm$ 2200*
<b>Hora 24</b>	<b>Meropenem</b>	1321 $\pm$ 689	3041 $\pm$ 1001*
	<b>Rifampicina</b>	1535 $\pm$ 738	1792 $\pm$ 1145
	<b>MPN + RIF</b>	2545 $\pm$ 2442	3066 $\pm$ 2337
	<b>Control</b>	1801 $\pm$ 1332	2113 $\pm$ 776

\* p < 0,05

**Tabla 4-12.** Comparación de los valores de leucocitos en LCR con ambas cepas

	Tratamiento	Cepa HUB SIII Lactato mmol/l	Cepa HUB 2349 Lactato mmol/l
<b>Hora 0</b>	<b>Meropenem</b>	3,75 ± 1,28	6,21 ± 0,67*
	<b>Rifampicina</b>	3,18 ± 1,22	7,02 ± 1,88*
	<b>MPN + RIF</b>	4,39 ± 1,11	7,06 ± 1,25*
	<b>Control</b>	3,82 ± 1,25	6,33 ± 1,88*
<b>Hora 2</b>	<b>Meropenem</b>	3,54 ± 1,33	5,01 ± 0,41*
	<b>Rifampicina</b>	3,17 ± 0,79	6,58 ± 1,71*
	<b>MPN + RIF</b>	3,79 ± 0,92	7,00 ± 1,75*
	<b>Control</b>	3,52 ± 1,08	5,37 ± 1,46*
<b>Hora 6</b>	<b>Meropenem</b>	3,24 ± 1,35	4,14 ± 0,71
	<b>Rifampicina</b>	2,82 ± 0,82	5,82 ± 1,62*
	<b>MPN + RIF</b>	3,49 ± 0,80	5,39 ± 1,75*
	<b>Control</b>	3,20 ± 0,89	5,35 ± 1,30*
<b>Hora 24</b>	<b>Meropenem</b>	1,95 ± 0,93	4,02 ± 1,49*
	<b>Rifampicina</b>	2,33 ± 1,44	3,14 ± 0,60
	<b>MPN + RIF</b>	2,18 ± 0,79	5,96 ± 2,10 *
	<b>Control</b>	3,62 ± 0,87	3,59 ± 0,85

\* p < 0,05

**Tabla 4-13.** Comparación de los valores de lactato en LCR con ambas cepas

	Tratamiento	Cepa HUB SIII Proteínas g/l	Cepa HUB 2349 Proteínas g/l
<b>Hora 0</b>	<b>Meropenem</b>	1,00 ± 0,39	1,61 ± 0,60*
	<b>Rifampicina</b>	1,27 ± 0,83	0,98 ± 0,49
	<b>MPN + RIF</b>	1,86 ± 1,07	2,49 ± 0,86
	<b>Control</b>	1,45 ± 0,70	2,05 ± 0,76
<b>Hora 2</b>	<b>Meropenem</b>	1,35 ± 0,48	2,34 ± 0,45*
	<b>Rifampicina</b>	1,71 ± 0,60	1,30 ± 0,43
	<b>MPN + RIF</b>	2,04 ± 0,83	3,18 ± 1,08*
	<b>Control</b>	1,66 ± 0,68	2,24 ± 0,75
<b>Hora 6</b>	<b>Meropenem</b>	1,52 ± 0,37	2,11 ± 0,73
	<b>Rifampicina</b>	1,61 ± 0,58	1,43 ± 0,52
	<b>MPN + RIF</b>	2,00 ± 0,49	3,00 ± 0,98*
	<b>Control</b>	2,05 ± 0,91	2,47 ± 0,91
<b>Hora 24</b>	<b>Meropenem</b>	1,53 ± 0,56	2,47 ± 0,98
	<b>Rifampicina</b>	1,56 ± 0,49	1,27 ± 0,56
	<b>MPN + RIF</b>	2,07 ± 0,64	3,11 ± 0,71*
	<b>Control</b>	2,08 ± 0,74	2,05 ± 0,81

\* p < 0,05

**Tabla 4-14.** Comparación de los valores de proteínas en LCR con ambas cepas

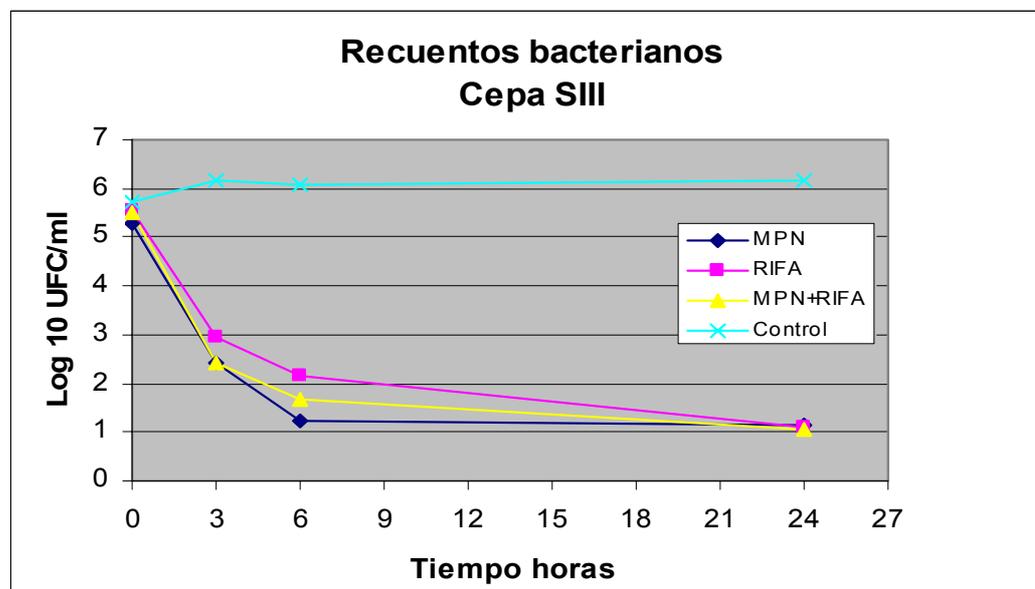
## **7. Evaluar la eficacia terapéutica y la respuesta inflamatoria de meropenem y rifampicina en el modelo de meningitis en la cobaya**

### **7.1. EFICACIA TERAPÉUTICA CEPA HUB SIII**

A las 18 horas de la inoculación el 100% de los animales presentan el hemocultivo positivo para *S. pneumoniae*. La mortalidad fue del 44% (4/9) en el grupo control y no se produjo ninguna muerte en los animales tratados.

La concentración bacteriana inicial en el LCR y los decrecimientos bacterianos a las 3, 6 y 24 horas se encuentran reflejados en la figura 4-9 y en la tabla 4-15.

No se produjeron fracasos terapéuticos ni recrecimientos bacterianos con ningún grupo terapéutico. Todos los tratamientos son eficaces y bactericidas desde las 6 horas.



**Figura 4-9.** Recuentos bacterianos en LCR de las cobayas inoculadas con la cepa HUB SIII

Tratamiento	Log ufc/ml 0h media±DE	Δlog ufc/ml 3h media	Δlog ufc/ml 6h media	Δlog ufc/ml 24h media
<b>Control</b>	5,71 ± 0,58	+ 0,45	+ 0,36	- 0,33
<b>Meropenem</b>	5,30 ± 0,65	- 2,87 *	- 4,05 *	- 4,14 *
<b>Rifampicina</b>	5,55 ± 0,35	- 2,61 *	- 3,41 *	- 4,44 *
<b>MPN+RIF</b>	5,50 ± 0,57	- 3,08 *	- 3,90 *	- 4,48 *

\* vs control p<0,000

**Tabla 4-15.** Variaciones en los recuentos bacterianos del LCR. Cepa HUB SIII

## 7. 2. RESPUESTA INFLAMATORIA CEPA HUB SIII

Los valores de lactato, proteínas y leucocitos en LCR en los diferentes puntos horarios y con los distintos tratamientos se pueden observar en la tabla 4-16.

A las 24 horas se produce un descenso de los parámetros inflamatorios con todos los tratamientos, pero sólo lo hace de forma significativa el lactato.

	Tratamiento	Leucocitos (cél/ $\mu$ l)	Lactato mmol/l	Proteínas g/l
<b>Hora 0</b>	<b>Meropenem</b>	723 $\pm$ 976	1,51 $\pm$ 0,62	0,71 $\pm$ 0,66
	<b>Rifampicina</b>	486 $\pm$ 182	1,66 $\pm$ 0,44	0,55 $\pm$ 0,21
	<b>MPN + RIF</b>	1239 $\pm$ 2031	2,11 $\pm$ 0,83	0,73 $\pm$ 0,26
	<b>Control</b>	1584 $\pm$ 1249	2,76 $\pm$ 1,30	0,79 $\pm$ 0,49
<b>Hora 3</b>	<b>Meropenem</b>	2501 $\pm$ 4255	2,25 $\pm$ 1,52	1,08 $\pm$ 1,12
	<b>Rifampicina</b>	1394 $\pm$ 2343	2,10 $\pm$ 0,79	0,83 $\pm$ 0,36
	<b>MPN + RIF</b>	1306 $\pm$ 1754	2,14 $\pm$ 1,14	0,85 $\pm$ 0,52
	<b>Control</b>	1547 $\pm$ 1611	2,63 $\pm$ 1,13	0,77 $\pm$ 0,23
<b>Hora 6</b>	<b>Meropenem</b>	7086 $\pm$ 7439	4,62 $\pm$ 1,96	1,50 $\pm$ 0,71
	<b>Rifampicina</b>	3837 $\pm$ 4578	3,49 $\pm$ 1,41	1,29 $\pm$ 0,89
	<b>MPN + RIF</b>	6559 $\pm$ 9982	3,42 $\pm$ 1,43	1,22 $\pm$ 0,42
	<b>Control</b>	5293 $\pm$ 3397	5,41 $\pm$ 1,93	1,82 $\pm$ 0,94
<b>Hora 24</b>	<b>Meropenem</b>	609 $\pm$ 799	1,48 $\pm$ 0,41 *	0,57 $\pm$ 0,32
	<b>Rifampicina</b>	1856 $\pm$ 2410	2,02 $\pm$ 0,80 *	0,88 $\pm$ 0,36
	<b>MPN + RIF</b>	1055 $\pm$ 1334	2,20 $\pm$ 1,24 *	0,67 $\pm$ 0,48
	<b>Control</b>	2955 $\pm$ 1568	4,16 $\pm$ 0,65	1,20 $\pm$ 0,42

\*  $p < 0,05$  vs grupo control

**Tabla 4-16.** Parámetros inflamatorios. Cepa HUB SIII

### 7. 3. EFICACIA TERAPÉUTICA CEPA HUB 2349

A las 18 horas de la inoculación el 100% de los animales presentan el hemocultivo positivo para *S. pneumoniae*. No se produjo ninguna muerte en los animales tratados ni en los controles.

La concentración bacteriana inicial en el LCR y los decrecimientos bacterianos a las 3, 6 y 24 horas se encuentran reflejados en la figura 4-10 y en la tabla 4-17.

No se produjeron fracasos terapéuticos ni recrecimientos bacterianos con ningún grupo terapéutico. Meropenem en solitario y en combinación es bactericida desde las 6 horas, la adición de rifampicina al meropenem no aumenta la eficacia del antibiótico en solitario. La rifampicina es bactericida a las 24 horas.

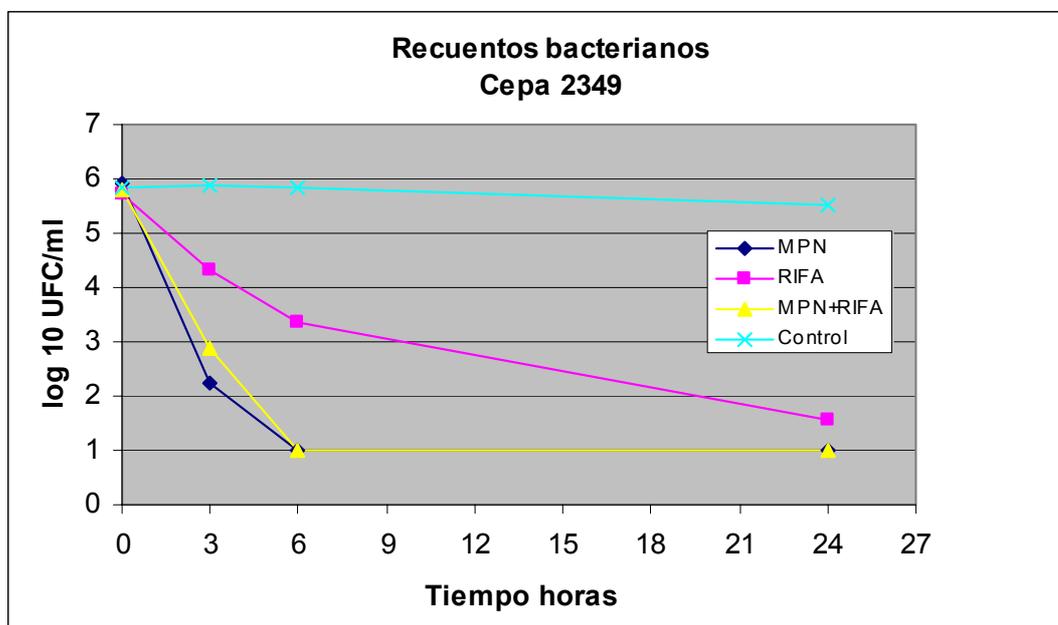


Figura 4-10. Recuentos bacterianos en LCR de las cobayas inoculadas con la cepa HUB 2349

Tratamiento	Log ufc/ml 0h media±DE	Δlog ufc/ml 3h media	Δlog ufc/ml 6h media	Δlog ufc/ml 24h media
<b>Control</b>	5,81 ± 0,43	+ 0,09	+ 0,01	- 0,49
<b>Meropenem</b>	5,91 ± 0,34	- 3,67 *#	- 4,92 *#	- 4,92 *
<b>Rifampicina</b>	5,71 ± 0,24	- 1,40 *	- 2,35 *	- 4,13 *
<b>MPN+RIF</b>	5,80 ± 0,72	- 2,92 *#	- 4,81 *#	- 4,81 *

\* vs control p<0,000

# vs rifampicina p<0,000

**Tabla 4-17.** Variaciones en los recuentos bacterianos del LCR. Cepa HUB 2349

#### 7. 4. RESPUESTA INFLAMATORIA CEPA HUB 2349

Los valores de lactato, proteínas y leucocitos en LCR en los diferentes puntos horarios y con los distintos tratamientos se pueden observar en la tabla 4-18.

El tratamiento con meropenem y la combinación de meropenem y rifampicina provocan un aumento de los parámetros inflamatorios en las primeras horas para posteriormente descender, alcanzando significación estadística los leucocitos y el lactato a las 24 horas en todos los tratamientos.

	Tratamiento	Leucocitos (cél/ $\mu$ l)	Lactato mmol/l	Proteínas g/l
<b>Hora 0</b>	<b>Meropenem</b>	4961 $\pm$ 6629	4,21 $\pm$ 1,77	1,39 $\pm$ 1,15
	<b>Rifampicina</b>	2717 $\pm$ 2375	3,23 $\pm$ 1,23	0,80 $\pm$ 0,40
	<b>MPN + RIF</b>	3329 $\pm$ 3357	3,77 $\pm$ 1,58	0,87 $\pm$ 0,62
	<b>Control</b>	3094 $\pm$ 1647	3,46 $\pm$ 1,40	1,37 $\pm$ 0,59
<b>Hora 3</b>	<b>Meropenem</b>	2773 $\pm$ 3791	3,59 $\pm$ 1,30	0,94 $\pm$ 0,28
	<b>Rifampicina</b>	6230 $\pm$ 6820	4,35 $\pm$ 1,96	1,47 $\pm$ 0,90
	<b>MPN + RIF</b>	6363 $\pm$ 4654	4,51 $\pm$ 1,28	1,51 $\pm$ 0,43
	<b>Control</b>	3233 $\pm$ 2640	4,42 $\pm$ 2,12	1,27 $\pm$ 0,49
<b>Hora 6</b>	<b>Meropenem</b>	9478 $\pm$ 3462	5,95 $\pm$ 1,80	1,92 $\pm$ 0,83
	<b>Rifampicina</b>	4698 $\pm$ 3734	4,05 $\pm$ 1,10	1,00 $\pm$ 0,25
	<b>MPN + RIF</b>	11480 $\pm$ 7438	5,23 $\pm$ 1,38	1,39 $\pm$ 0,57
	<b>Control</b>	5715 $\pm$ 4049	4,53 $\pm$ 0,93	1,78 $\pm$ 0,56
<b>Hora 24</b>	<b>Meropenem</b>	723 $\pm$ 222 *	1,99 $\pm$ 0,33 *	1,10 $\pm$ 1,35
	<b>Rifampicina</b>	1073 $\pm$ 918 *	1,79 $\pm$ 0,46 *	0,61 $\pm$ 0,21
	<b>MPN + RIF</b>	984 $\pm$ 1179 *	1,93 $\pm$ 0,26 *	0,65 $\pm$ 0,10
	<b>Control</b>	4196 $\pm$ 2891	3,78 $\pm$ 1,89	1,26 $\pm$ 0,48

\*  $p < 0,05$  vs grupo control

**Tabla 4-18.** Parámetros inflamatorios. Cepa HUB 2349

### 7. 5. NIVELES DE ANTIBIÓTICO EN EL LCR DE LA COBAYA

Los niveles de meropenem y rifampicina obtenidos en el LCR de la cobaya con ambas cepas se reflejan en la tabla 4-19.

		Hora 3 [mg/l]	Hora 6 [mg/l]	Hora 24 [mg/l]
<b>Cepa HUB 2349</b>	<b>Meropenem</b>	0,46 ± 0,12	0,28 ± 0,13	< 0,06 *
	<b>Rifampicina</b>	0,46 ± 0,09	0,38 ± 0,18	0,05 ± 0,04
<b>Cepa HUB SIII</b>	<b>Meropenem</b>	0,39 ± 0,24	0,11 ± 0,16	< 0,06 *
	<b>Rifampicina</b>	0,75 ± 0,20	0,63 ± 0,16	0,07 ± 0,03

\* Por debajo del nivel de detección

**Tabla 4-19.** Niveles de antibiótico en LCR de la cobaya

## **8. Comparación de los resultados de la meningitis en la cobaya con ambas cepas**

Meroepenem y la combinación de meroepenem y rifampicina son eficaces en ambas cepas y bactericidas desde las 6 horas de tratamiento. En la cepa sensible rifampicina también es bactericida desde las 6 horas, mientras que en la resistente no lo consigue hasta las 24 horas ( $p < 0,01$ ). No se observa fracaso terapéutico ni recrecimiento en ninguno de los animales tratados, sea cual sea la cepa con la que se han inoculado.

La cepa resistente provoca un mayor aumento de los parámetros inflamatorios: leucocitos, lactato y proteínas en el LCR que la cepa sensible, pero sólo en algunos puntos horarios este aumento alcanza significación estadística (tablas 4-20, 4-21 y 4-22).

Con ambas cepas todos los animales tienen el hemocultivo positivo a la hora 0.

Sin tratamiento se produce la muerte en el 44% de los animales inoculados con la cepa HUB SIII (4/9) y en ninguno de los animales inoculados con la cepa HUB 2349 (8). No se produce ninguna muerte en los animales a los que se les ha administrado tratamiento antibiótico, sea cual sea la cepa con la que hayan sido infectados.

	Tratamiento	Cepa HUB SIII Leucocitos (cél/ $\mu$ l)	Cepa HUB 2349 Leucocitos (cél/ $\mu$ l)
<b>Hora 0</b>	<b>Meropenem</b>	723 $\pm$ 976	4961 $\pm$ 6629
	<b>Rifampicina</b>	486 $\pm$ 182	2717 $\pm$ 2375 *
	<b>MPN + RIF</b>	1239 $\pm$ 2031	3329 $\pm$ 3357
	<b>Control</b>	1584 $\pm$ 1249	3094 $\pm$ 1647*
<b>Hora 3</b>	<b>Meropenem</b>	2501 $\pm$ 4255	2773 $\pm$ 3791
	<b>Rifampicina</b>	1394 $\pm$ 2343	6230 $\pm$ 6820
	<b>MPN + RIF</b>	1306 $\pm$ 1754	6363 $\pm$ 4654 *
	<b>Control</b>	1547 $\pm$ 1611	3233 $\pm$ 2640
<b>Hora 6</b>	<b>Meropenem</b>	7086 $\pm$ 7439	9478 $\pm$ 3462
	<b>Rifampicina</b>	3837 $\pm$ 4578	4698 $\pm$ 3734
	<b>MPN + RIF</b>	6559 $\pm$ 9982	11480 $\pm$ 7438
	<b>Control</b>	5293 $\pm$ 3397	5715 $\pm$ 4049
<b>Hora 24</b>	<b>Meropenem</b>	609 $\pm$ 799	723 $\pm$ 222
	<b>Rifampicina</b>	1856 $\pm$ 2410	1073 $\pm$ 918
	<b>MPN + RIF</b>	1055 $\pm$ 1334	984 $\pm$ 1179
	<b>Control</b>	2955 $\pm$ 1568	4196 $\pm$ 2891

\* p < 0,05

**Tabla 4-20.** Comparación de los valores de leucocitos en LCR con ambas cepas

	Tratamiento	Cepa HUB SIII Lactato mmol/l	Cepa HUB 2349 Lactato mmol/l
<b>Hora 0</b>	<b>Meropenem</b>	1,51 ± 0,62	4,21 ± 1,77 *
	<b>Rifampicina</b>	1,66 ± 0,44	3,23 ± 1,23*
	<b>MPN + RIF</b>	2,11 ± 0,83	3,77 ± 1,58 *
	<b>Control</b>	2,76 ± 1,30	3,46 ± 1,40
<b>Hora 3</b>	<b>Meropenem</b>	2,25 ± 1,52	3,59 ± 1,30
	<b>Rifampicina</b>	2,10 ± 0,79	4,35 ± 1,96 *
	<b>MPN + RIF</b>	2,14 ± 1,14	4,51 ± 1,28 *
	<b>Control</b>	2,63 ± 1,13	4,42 ± 2,12
<b>Hora 6</b>	<b>Meropenem</b>	4,62 ± 1,96	5,95 ± 1,80
	<b>Rifampicina</b>	3,49 ± 1,41	4,05 ± 1,10
	<b>MPN + RIF</b>	3,42 ± 1,43	5,23 ± 1,38 *
	<b>Control</b>	5,41 ± 1,93	4,53 ± 0,93
<b>Hora 24</b>	<b>Meropenem</b>	1,48 ± 0,41	1,99 ± 0,33 *
	<b>Rifampicina</b>	2,02 ± 0,80	1,79 ± 0,46
	<b>MPN + RIF</b>	2,20 ± 1,24	1,93 ± 0,26
	<b>Control</b>	4,16 ± 0,65	3,78 ± 1,89

\* p < 0,05

**Tabla 4-21.** Comparación de los valores de lactato en LCR con ambas cepas

	Tratamiento	Cepa HUB SIII Proteínas g/l	Cepa HUB 2349 Proteínas g/l
<b>Hora 0</b>	<b>Meropenem</b>	0,71 ± 0,66	1,39 ± 1,15
	<b>Rifampicina</b>	0,55 ± 0,21	0,80 ± 0,40
	<b>MPN + RIF</b>	0,73 ± 0,26	0,87 ± 0,62
	<b>Control</b>	0,79 ± 0,49	1,37 ± 0,59*
<b>Hora 3</b>	<b>Meropenem</b>	1,08 ± 1,12	0,94 ± 0,28
	<b>Rifampicina</b>	0,83 ± 0,36	1,47 ± 0,90
	<b>MPN + RIF</b>	0,85 ± 0,52	1,51 ± 0,43 *
	<b>Control</b>	0,77 ± 0,23	1,27 ± 0,49 *
<b>Hora 6</b>	<b>Meropenem</b>	1,50 ± 0,71	1,92 ± 0,83
	<b>Rifampicina</b>	1,29 ± 0,89	1,00 ± 0,25
	<b>MPN + RIF</b>	1,22 ± 0,42	1,39 ± 0,57
	<b>Control</b>	1,82 ± 0,94	1,78 ± 0,56
<b>Hora 24</b>	<b>Meropenem</b>	0,57 ± 0,32	1,10 ± 1,35
	<b>Rifampicina</b>	0,88 ± 0,36	0,61 ± 0,21
	<b>MPN + RIF</b>	0,67 ± 0,48	0,65 ± 0,10
	<b>Control</b>	1,20 ± 0,42	1,26 ± 0,48

\* p < 0,05

**Tabla 4-22.** Comparación de los valores de proteínas en LCR con ambas cepas

## V. Discusión



## **1. Modelos de meningitis experimental**

Tal como se ha comentado en otros apartados de este trabajo, en los últimos años se han publicado una amplia variedad de modelos de meningitis que utilizaban diferentes animales. De todos los modelos, el que ha tenido mayor relevancia por la profusión de información que ha generado es el de la meningitis en conejo, desarrollado por Dacey y Sande<sup>168</sup>; actualmente continúa siendo el modelo más utilizado para evaluar alternativas terapéuticas y para estudiar el proceso inflamatorio que se genera en la infección meníngea.

La principal limitación de este modelo es la forma artificial de provocar la infección, por inoculación directa en el LCR, que no es igual que en la enfermedad humana. Por otro lado, el modelo del conejo tiene indudables ventajas, su relativo mayor tamaño permite obtener diferentes muestras de sangre y LCR en un mismo animal y evaluar la eficacia y la farmacocinética de los diversos antibióticos. Además, el modelo de meningitis en el conejo tiene un manejo relativamente sencillo y es reproducible. En nuestro estudio, tras la inoculación intracisternal de  $10^6$  ufc/ml de las cepas de *S. pneumoniae* objeto de estudio, se obtuvieron unos recuentos bacterianos iniciales del orden de  $10^4$ - $10^6$  ufc/ml, adecuados para los posteriores estudios de eficacia terapéutica y, éstos se mantuvieron elevados durante las 24 horas que duraba el experimento. La mortalidad fue del 62-63% según la cepa utilizada, lo que refleja la virulencia del modelo. Dependiendo también de la cepa, la bacteriemia a la hora 0 osciló entre 76-100% de los animales.

A pesar de la amplia utilización de este modelo para estudiar la eficacia de muchos antibióticos<sup>188-190</sup>, en este estudio pretendíamos evaluar la eficacia de meropenem y, en el conejo, a diferencia de los humanos y otros animales de laboratorio, como la cobaya, este antibiótico es fácilmente hidrolizado por las DHP-I renales<sup>21</sup> y este hecho puede interferir en los resultados de eficacia cuando se utiliza este antibiótico. Tal como recomiendan algunos autores<sup>22</sup> se utilizó una dosis elevada de meropenem (150 mg/kg/6h) con objeto de

compensar su posible hidrólisis. En los resultados de farmacocinética que se realizaron con una única dosis de 150 mg/kg/iv de meropenem antes de iniciar los experimentos de eficacia terapéutica, se obtuvo una  $C_{max}$  en LCR de 4,95 µg/ml, similar a la obtenida en humanos (0,9-6,5 mg/l) con 40 mg/kg<sup>18</sup>, con un  $t > CMI$  de 5,17 horas. En vista de estos resultados se decidió administrar el meropenem cada 6 horas, lo que aseguraba que en la cepa resistente estaríamos el 86% del intervalo de dosificación en valores por encima de la CMI, y en la cepa sensible el 100% del tiempo.

La rifampicina ha sido estudiada por varios autores que han utilizado el modelo de meningitis neumocócica en conejo, por lo que su farmacocinética es conocida. Nosotros, siguiendo las recomendaciones de estos autores<sup>12,191</sup> realizamos estudios de farmacocinética con una única dosis de 15 mg/kg/iv que confirmaron sus resultados, lo que sugirió la conveniencia de administrar una única dosis de rifampicina iv cada 24 horas.

Con el modelo de meningitis en cobaya hay una experiencia limitada y la farmacocinética de los antibióticos es menos conocida. Nairm y col. estudiaron la eficacia de meropenem en la cobaya<sup>25</sup>; inoculaba los animales con 100 µl de una suspensión de  $10^6$ - $10^7$  ufc/ml de diferentes bacterias responsables de meningitis, entre las que se encontraban 3 cepas de *S. pneumoniae*. Se les practicaba un orificio en el cráneo con un taladro, a través del cual se introducía el inóculo bacteriano y, a continuación, se sellaba con cera y se cerraba la incisión con una sutura. Estos autores administraban diferentes concentraciones de meropenem (10-20-40 mg/kg) por vía intraperitoneal cada 3 horas, basándose en que la vida media del antibiótico era de 15 min y, que en algunos animales infectados con *Neisseria meningitidis*, se obtenían niveles de meropenem en LCR del orden de 1,2-2,9 µl/ml, en un periodo que oscilaba entre 30-60 minutos tras una dosis de 10 mg/kg.

Posteriormente, Maiques y col. modificaron sustancialmente el modelo y estudiaron la eficacia de meropenem en la meningitis por *Pseudomonas aeruginosa* en la cobaya<sup>171</sup>. Maiques administraba una dosis de 200 mg/kg de meropenem por vía intramuscular cada 8 horas; a las 4 horas de la

administración obtenía una concentración de meropenem en LCR que oscilaba entre 1,1 y 19,3 µg/ml, con un  $t > \text{CMI}$  de 4,13 horas, una vida media de 0,86 horas y una penetración en LCR del 6%.

Basándonos en la escasa información que teníamos, realizamos estudios de farmacocinética con una única dosis de 200 mg/kg/im de meropenem antes de iniciar los experimentos de eficacia terapéutica. Se obtuvo una  $C_{\text{max}}$  en LCR de 2,76 µg/ml, con una  $t > \text{CMI}$  de 4,02 horas y una penetración en LCR del 5,8%. A pesar de que la farmacocinética no era tan favorable como en el modelo del conejo, según la experiencia descrita, se decidió administrar el antibiótico cada 6 horas, lo que aseguraba que en la cepa resistente estaríamos aproximadamente el 70% del intervalo de dosificación por encima de la CMI.

No encontramos documentación sobre los parámetros farmacocinéticos de rifampicina en cobaya; realizamos un estudio con una única dosis de 30 mg/kg/im y obtuvimos una  $C_{\text{max}}$  en LCR de 0,65 µg/ml, con una  $t > \text{CMI}$  de 20,11 horas y una penetración en LCR de 6,5%. Ante estos resultados se decidió administrar una única dosis de rifampicina im cada 24 horas.

Además de la menor experiencia en el modelo de meningitis en cobaya para estudiar la eficacia de los antibióticos, otra importante limitación es el tamaño del animal, que no permite obtener varias muestras de sangre y LCR de un mismo animal. No obstante, este modelo, tal como lo describe Maiques, es más sencillo de manejo que el del conejo, ya que no requiere intervención quirúrgica previa para colocar la pieza metálica que permitirá fijar al animal al aparato de estereotaxia, ni tanta infraestructura. En nuestro estudio, tras la inoculación intracisternal de  $10^6$  ufc/ml de las cepas de *S. pneumoniae* objeto de estudio, se obtuvieron unos recuentos bacterianos iniciales del orden de  $10^6$  ufc/ml, adecuados para los posteriores estudios de eficacia terapéutica y, éstos se mantuvieron elevados durante las 24 horas que duraba el experimento. La mortalidad osciló entre 0-44% según la cepa utilizada. Con ambas cepas, a las 0 horas todos los animales presentaban bacteriemia.

Con objeto de paliar el hecho de tener sólo una muestra de LCR por animal, una vez adquirida la destreza adecuada y comprobar la buena tolerancia del animal, decidimos utilizar una cobaya para estudiar dos puntos horarios, un animal a la hora 0 y 6, y otro diferente para la hora 3 y 24. De esta forma aumentamos la fiabilidad del estudio y conseguimos reducir a la mitad el número de animales necesarios. En los estudios de experimentación con animales es fundamental utilizar el menor número de animales imprescindibles para obtener las conclusiones pertinentes.

## **2. Eficacia y respuesta inflamatoria de meropenem y rifampicina en el modelo de meningitis en conejo**

Un aspecto de especial importancia, ya señalado anteriormente, en el tratamiento de la meningitis es conseguir la rápida esterilización del LCR y contribuir lo mínimo posible a la respuesta inflamatoria, para evitar las graves secuelas de la enfermedad. Para ello, los antibióticos deben alcanzar niveles suficientes en el LCR y, tradicionalmente, se ha considerado que la concentración antibiótica debe estar al menos 8-10 veces por encima de la CMI del germen para considerar que el tratamiento es eficaz y seguro<sup>192</sup>.

En el modelo de meningitis en conejo, meropenem mostró eficacia frente a la cepa sensible a  $\beta$ -lactámicos. Sin embargo, en los experimentos con la cepa resistente la eficacia se demoró en el tiempo, observándose a las 6 horas de tratamiento fracaso terapéutico en 3/8 animales y recrecimiento en otros 3. A las 24 horas meropenem fue bactericida con ambas cepas, aunque el decrecimiento bacteriano fue mayor en la cepa sensible que en la resistente ( $4,32 \pm 0,38$  y  $3,36 \pm 1,25$ ;  $p = 0,007$ ). Las concentraciones de meropenem alcanzadas en LCR fueron similares en ambas cepas, aunque a las 6 horas fueron ligeramente inferiores en la cepa resistente ( $0,19 \pm 0,14$  frente a  $0,32 \pm 0,17$  mg/l). Aunque meropenem presentaba un  $t > \text{CMI}$  superior al 85% se observan fracasos terapéuticos y recrecimientos con la cepa resistente, lo que

sugiere que estos niveles de antibiótico algo por debajo de la CMI, pueden no ser suficientes para asegurar la eficacia.

Meropenem ha sido estudiado en el conejo a una dosis de 125 mg/kg en meningitis neumocócica resistente a cefalosporinas con diferentes resultados. Friedland y col. administraban meropenem cada 5 horas (2 dosis) y a pesar de obtener unas concentraciones en LCR ( $2,0 \pm 1,3 \mu\text{g/ml}$ ) superiores a la CMI, a las 24 horas cuando finalizaba el estudio no lograba esterilizar ningún animal<sup>23</sup>. Algunos autores han observado efecto bactericida cuando administraban meropenem cada 4 horas<sup>22,24</sup>, pero en uno de estos estudios, a las 8 horas de tratamiento sólo esterilizaba el LCR de 2/8 animales<sup>24</sup>. Kim y col. también observan efecto bactericida a las 10 horas de tratamiento tras dos dosis de meropenem, pero a las 24 horas recrece en todos los animales<sup>193</sup>. Para paliar la falta de esterilización y el recrecimiento observado por alguno de estos autores prolongamos el tratamiento durante 24 horas y aumentamos la dosis a 150 mg/kg; de esta forma conseguimos la esterilización de todos los animales a las 24 horas, pero persistieron los fracasos y recrecimientos a las 6 horas. Probablemente este fallo sea secundario a la rápida metabolización del antibiótico en el conejo por parte de las DHP-1 renales, más que a las condiciones farmacocinéticas del antibiótico en el LCR.

El tratamiento con rifampicina obtuvo buenos resultados en la infección producida por ambas cepas, mostró efecto bacteriostático a las 6 horas de tratamiento, siendo bactericida a las 24 horas. No se observaron fracasos terapéuticos ni aparecieron resistencias en ningún animal tratado con rifampicina. De la misma manera, otros autores han obtenido resultados similares<sup>12,191</sup>. Pese a todo, es bien conocido que el tratamiento de las infecciones por *S. pneumoniae* con rifampicina en monoterapia facilita la aparición de resistencias incluso durante el tratamiento<sup>182</sup>, lo que desaconseja su uso en monoterapia.

La combinación de antibióticos en la práctica clínica se realiza normalmente para incrementar el espectro antimicrobiano o bien para obtener un efecto sinérgico y aumentar la actividad bactericida, hecho que puede ser decisivo en

algunas infecciones graves como la meningitis, así como para evitar la aparición de resistencias. Rifampicina se ha utilizado con resultados satisfactorios en el tratamiento de infecciones del SNC causadas por *S. pneumoniae* y la combinación con cefotaxima/ceftriaxona se ha recomendado en el tratamiento de la meningitis neumocócica<sup>134,136</sup>, especialmente a los pacientes que se les administra dexametasona, ya que la concentración en LCR de la rifampicina no se ve afectada con su administración. En nuestro estudio la combinación meropenem más rifampicina mejoró de forma significativa ( $p < 0,005$ ) la eficacia de los antibióticos en solitario a las 6 horas cuando se utilizó la cepa resistente. Respecto a la cepa sensible la rifampicina no mejoró de forma significativa la actividad bactericida del meropenem en solitario, que ya era muy buena. Por otra parte, esta combinación no tendría justificación en el caso de cepas sensibles donde puede utilizarse  $\beta$ -lactámicos en monoterapia.

El tratamiento de la meningitis con  $\beta$ -lactámicos produce la liberación de componentes proinflamatorios de la pared bacteriana en el LCR y a la respuesta inflamatoria del huésped se ha atribuido la mortalidad y las importantes secuelas de la enfermedad. Algunos estudios han observado que la rifampicina consigue atenuar esta respuesta inflamatoria, reduciendo el daño cerebral y disminuyendo la mortalidad<sup>137,194</sup>. Ribes y col. mostraron que al añadir rifampicina a ceftriaxona disminuía la respuesta inflamatoria en el LCR en relación a los animales tratados con el  $\beta$ -lactámicos en solitario. Sin embargo en nuestro estudio no se observó este efecto modulador de la rifampicina, ya que los animales tratados con la combinación de meropenem y rifampicina mostraron una elevación de los valores de lactato y proteínas, así como del número de leucocitos superior a los tratamientos en solitario, aunque este aumento sólo alcanzó significación estadística para el lactato a las 24 horas ( $p < 0,001$ ).

### **3. Eficacia y respuesta inflamatoria de meropenem y rifampicina en el modelo de meningitis en cobaya**

En el modelo de meningitis en cobaya, meropenem a una dosis de 200 mg/kg/6h, se mostró muy eficaz, tanto en la cepa sensible como en la resistente, siendo bactericida desde las 3-6 horas de tratamiento, según cual fuera la cepa utilizada. A pesar de que los parámetros farmacocinéticos ( $C_{max}$  en LCR de 2,76  $\mu\text{g/ml}$  y 70% del tiempo por encima de la CMI) no eran tan favorables como en el modelo del conejo, todos los animales tratados con meropenem consiguen esterilizar el LCR, no observándose ningún fracaso terapéutico ni recrecimiento. Nairm y col. estudiaron la eficacia de meropenem en la meningitis producida por diferentes microorganismos en la cobaya<sup>25</sup>. En la meningitis neumocócica sensible a la penicilina, meropenem a una dosis de 10 mg/kg era tan eficaz como ceftriaxona, mientras que en la cepa resistente a penicilina, meropenem a una dosis de 40 mg/kg era significativamente más eficaz que ceftriaxona, aunque sólo conseguía esterilizar el LCR de 4/5 animales. Maiques y col. también utilizó meropenem en el tratamiento de la meningitis por *Pseudomonas aeruginosa* en la cobaya<sup>171</sup>; administraban 200 mg/kg/8h y lograban obtener una disminución de 2,5 log 10 a las 8 horas de tratamiento, similar a la observada con ceftazidime.

En la cobaya la combinación de meropenem y rifampicina no aumentó la eficacia de los antibióticos en solitario, con ninguna de ambas cepas.

El tratamiento con meropenem, la combinación de meropenem y rifampicina, y en menor medida rifampicina, provoca un aumento de los parámetros inflamatorios en las primeras horas de la infección. Del mismo modo que en el modelo del conejo, en la cobaya la rifampicina tampoco consigue atenuar la respuesta inflamatoria con ninguna de las dos cepas. No obstante, a las 24 horas en todos los tratamientos se observa una disminución de los parámetros inflamatorios en relación a los animales control, aunque ésta sólo alcanza significación estadística para los valores de lactato ( $p < 0,05$ ) en la cepa sensible y para el lactato y el número de leucocitos ( $p < 0,05$ ) en la cepa resistente.

#### **4. Congruencia entre el modelo del conejo y de la cobaya**

Tal como se ha comentado en un apartado anterior, en el modelo de meningitis en conejo, meropenem demoró su eficacia hasta las 24 horas de tratamiento, observándose fracasos terapéuticos y recrecimientos en algunos animales a pesar de presentar el antibiótico un  $t > CMI$  superior al 85%. Probablemente este fallo sea consecuencia de su rápida metabolización en el conejo por parte de las DHP-1 renales, más que a las condiciones farmacocinéticas del meropenem en el LCR, lo que sugiere que el modelo de meningitis en el conejo no es adecuado para estudiar el meropenem. Por el contrario, en el modelo de meningitis en la cobaya no se observó fracaso terapéutico en ningún animal y todos consiguen esterilizar el LCR, a pesar de que la farmacocinética del meropenem no era tan favorable como en el conejo, por lo que se constata que el modelo de meningitis en cobaya es más adecuado que el del conejo para estudiar el meropenem.

No existe por tanto congruencia entre el modelo del conejo y el de la cobaya. Este trabajo pone de manifiesto la importancia que tiene elegir adecuadamente el modelo animal para el desarrollo de estudios de eficacia antibiótica.

#### **5. Actividad *in vitro* de meropenem y rifampicina**

Los estudios *in vitro*, mediante curvas de letalidad, constituyen el primer eslabón en el estudio y comparación de la actividad bactericida y sinergia de nuevos antibióticos, tanto en solitario como en combinación; aunque carecen del entorno fisiológico e inmunológico que nos aporta el modelo experimental, nos proporcionan información sobre la dinámica de la actividad antibacteriana y nos permite observar recrecimientos bacterianos y/o la aparición de resistencias a los antibióticos estudiados. Este conocimiento es esencial en los casos en los que, como en la meningitis, el tratamiento óptimo requiere la rápida actividad bactericida en LCR, porque el retraso en la esterilización del

mismo se ha asociado a peor pronóstico y a un aumento de las secuelas en niños<sup>128</sup>.

Existen diferentes métodos para realizar estudios *in vitro*: determinación de CMB, curvas de letalidad, tablero de ajedrez y actividad bactericida en líquidos orgánicos<sup>195</sup>, que están sujetos a múltiples variables biológicas o técnicas que pueden influir en los resultados obtenidos, y nunca son un reflejo exacto de lo que acontece en el modelo *in vivo* o en la clínica. Las curvas de letalidad han sido utilizadas por diferentes autores para predecir la actividad bactericida y/o sinérgica *in vivo*<sup>143</sup>, porque valoran la dinámica de los antibióticos solos o en combinación a lo largo de un periodo de tiempo, mediante el recuento de número de bacterias viables a unas horas determinadas.

En nuestro estudio, analizamos las CMI, CMB y el efecto bactericida mediante curvas de letalidad de los dos antibióticos en solitario y combinados, como un paso previo al modelo experimental y para confrontar finalmente ambos resultados *in vitro* e *in vivo* y extraer unas conclusiones más consistentes. El número de UFC/ml viables en todos los tubos problema y en el control de crecimiento se determinó en el momento inicial de la inoculación del microorganismo (0 horas) y a las 6 y 24 horas de incubación, con un rango de concentraciones de los antibióticos ajustadas a las CMI<sub>s</sub> y a las concentraciones alcanzadas en el LCR, con objeto de estudiar la actividad antimicrobiana durante las primeras horas de tratamiento.

En las combinaciones de antibióticos, algunos autores utilizan concentraciones fijas de los valores alcanzables en LCR cuando existe inflamación meníngea, lo que resulta útil para predecir la máxima lisis bacteriana. En nuestro caso utilizamos los antibióticos a concentraciones sub-inhedoras (1x, 1/2x, 1/4x) con objeto de optimizar la probabilidad de detectar sinergismo.

Antibióticos carbapenémicos como imipenem y meropenem han demostrado poseer una buena actividad frente a neumococos sensibles y resistentes a cefalosporinas<sup>143,173</sup>. Aunque imipenem muestra mejor actividad *in vitro* que meropenem<sup>173</sup>, no suele recomendarse para el tratamiento de la meningitis por

su capacidad de provocar convulsiones<sup>16</sup>; por el contrario, meropenem no tiene esta capacidad epileptógena, presentando una incidencia de convulsiones similar o incluso inferior que cefotaxima<sup>196</sup>.

En nuestro estudio meropenem a concentraciones por encima de la CMI mostró un efecto bactericida, confirmando los resultados obtenidos por otros autores<sup>22,139</sup>. Por el contrario con la rifampicina sólo se observó un efecto bacteriostático a todas las concentraciones en las que fue estudiada, hecho también observado por más autores<sup>177,191,197</sup>. A las 24 horas de incubación se detectaron mutantes resistentes en todas las curvas que tenían rifampicina, ya sea en solitario o en combinación con meropenem. Sin embargo, en ambos modelos animales no se observó ningún fracaso terapéutico ni recrecimiento bacteriano en los animales tratados con rifampicina, consiguiéndose a las 24 horas la esterilización del LCR de todos los animales. Esta discordancia entre la actividad de la rifampicina *in vivo* e *in vitro* ha sido ya descrita previamente<sup>177,191</sup>, pero se desconoce la causa. Una posible explicación sobre la mayor actividad bactericida de la rifampicina en el animal de experimentación podría deberse a la alta liposolubilidad de este antibiótico que facilitaría su penetración a través de las membranas celulares y contribuiría a una más rápida esterilización del LCR<sup>198</sup>. Es posible que si hubiéramos prolongado el tratamiento con rifampicina durante más tiempo, probablemente hubieran aparecido resistencias también en el animal.

La combinación de antibióticos en la práctica clínica se realiza, además de para aumentar la actividad bactericida, para prevenir la aparición de resistencias a alguno de los antibióticos de la combinación, ya que se necesitarían dos mutaciones consecutivas para que se produjese el crecimiento de las mutantes cuando se utiliza dos antibióticos de diferentes clases, sin resistencias cruzadas entre ellos. En nuestro estudio la utilización de rifampicina en combinación con meropenem no ha impedido la aparición de mutantes resistentes *in vitro*, pero si que ha manifestado un efecto protector en el modelo animal.

Los estudios *in vitro* de la acción sinérgica de la rifampicina en asociación con otros antibióticos ofrece resultados contradictorios. Algunos autores han descrito que la asociación de rifampicina más  $\beta$ -lactámicos o vancomicina disminuye la actividad bactericida del antibiótico en solitario observando incluso antagonismo<sup>177,197,199,200</sup>, aunque la mayoría de los estudios *in vitro* demuestran que la asociación de rifampicina con otros antibióticos se comporta como indiferente<sup>178,191,197,201</sup>. En nuestro estudio, la combinación de meropenem más rifampicina mostró efecto indiferente pero también sinergia en algunas de las concentraciones estudiadas con ambas cepas; en un reciente estudio japonés la combinación de meropenem y rifampicina también era sinérgica<sup>202</sup>.

Estas discrepancias observadas en los diferentes estudios podrían explicarse por las variadas metodologías empleadas en los estudios *in vitro*, así como por la utilización de diferentes concentraciones de los antibióticos que, en algunos casos, están muy por encima de la CMI (incluso 25-50 veces para la rifampicina)<sup>199</sup>, en otras son las alcanzables en LCR o bien son sub-inhedoras. No obstante, nuestra conclusión en este punto pretende hacer énfasis en que las concentraciones sub-inhedoras de meropenem en combinación con rifampicina, frente a dos cepas con diferente sensibilidad a  $\beta$ -lactámicos no son necesariamente antagónicas, sino que en algunas combinaciones son incluso sinérgicas.

A pesar de los datos que hemos expuesto y de los resultados algunas veces contradictorios de las combinaciones con rifampicina *in vitro*, diversos autores<sup>15,134,136,203</sup> recomiendan incluir la rifampicina en las combinaciones antibióticas para tratar la meningitis neumocócica resistente a cefalosporinas, combinaciones que resultan atractivas porque su eficacia no se ve modificada en presencia de dexametasona<sup>159</sup>. La experiencia clínica con rifampicina más vancomicina, más amplia en niños que en adultos<sup>10,11,204</sup>, confirma la eficacia y la prevención de la aparición de resistencias mostradas en el animal<sup>12,23</sup>. La experiencia con  $\beta$ -lactámicos y rifampicina es mucho más escasa aunque en un trabajo en niños, la combinación de ceftriaxona más rifampicina aumentó significativamente la eficacia respecto a las monoterapias, frente a dos cepas de *S. pneumoniae* resistentes<sup>180</sup>. Nuestros resultados con meropenem más

rifampicina sustentan las buenas expectativas que otros estudios que incluían rifampicina han generado, pero se necesitan estudios clínicos que confirmen estos resultados para poder extraer conclusiones definitivas.

## **6. Consideraciones finales**

La extrapolación de los resultados obtenidos en un modelo de experimentación animal en el ámbito de la terapia clínica debe realizarse siempre con mucha cautela por las diferencias en la farmacocinética y otras variables que puedan influir. Sin embargo, la homogeneidad de los datos obtenidos con nuestros modelos y los resultados farmacocinéticos y farmacodinámicos, le confieren una notable fiabilidad a la hora de aplicar sus conclusiones a la enfermedad humana. Si bien, este trabajo pone de manifiesto la importancia de la adecuada elección del modelo animal en el desarrollo de estudios de eficacia antibiótica.

Nuestro estudio nos llevaría a la conclusión final de que meropenem y la combinación de meropenem y rifampicina han mostrado una buena actividad bactericida en ambos modelos experimentales de meningitis y pueden ser considerados como una alternativa en el tratamiento de la meningitis bacteriana, constituyendo un tratamiento adecuado para las meningitis producidas por neumococos resistentes a cefalosporinas.

## VI. Conclusiones



## **Conclusiones**

1. Las dos cepas de *S. pneumoniae* incluidas en el estudio han sido capaces de inducir meningitis y generar una respuesta inflamatoria en el modelo animal del conejo y de la cobaya.
2. Meropenem ha demostrado su eficacia en el tratamiento de la meningitis neumocócica en la cobaya, frente a dos cepas con diferente sensibilidad a  $\beta$ -lactámicos. La combinación de meropenem más rifampicina no aumenta la eficacia del meropenem en solitario.
3. En el modelo de meningitis en el conejo, meropenem ha mostrado eficacia frente a la cepa sensible a  $\beta$ -lactámicos, pero con la cepa resistente se ha observado un retraso en el efecto bactericida, detectándose fracasos terapéuticos y recrecimiento bacteriano. En la cepa resistente la combinación de meropenem más rifampicina mejora significativamente la eficacia de meropenem en solitario.
4. No hay congruencia entre el modelo del conejo y de la cobaya. El retardo en la eficacia de meropenem frente a la cepa resistente en la meningitis en el conejo sugiere que este modelo no es adecuado para estudiar este antibiótico y pone de manifiesto la importancia de la correcta elección del modelo animal en el desarrollo de estudios de eficacia antibiótica.
5. En ambas cepas la combinación de meropenem y rifampicina *in vitro* es, según las concentraciones estudiadas, sinérgica o indiferente.
6. Se observa la aparición de mutantes resistentes en todas las curvas con rifampicina y la combinación con meropenem no impide su aparición.
7. Existen discordancias en la actividad de la rifampicina *in vitro* e *in vivo*.

8. Meropenem y la combinación de meropenem y rifampicina pueden ser considerados como una alternativa en el tratamiento de la meningitis bacteriana, y constituyen un tratamiento adecuado para las meningitis producidas por neumococos resistentes a cefalosporinas.

## VII. Bibliografía



1. Kastenbauer S, Pfister HW. Pneumococcal meningitis in adults spectrum of complications and prognosis factors in a series of 87 cases. *Brain* 2003; 126:1015-25.
2. Weisfelt M, van de Beek D, Spanjaard L, Reitsma JB, de Gans J. Clinical features, complications, and outcome in adults with pneumococcal meningitis: a prospective case series. *Lancet Neurol* 2006; 5: 123-9.
3. Jacobs MR, Koornhof HJ, Robins-Browne RM, Stevenson CM, Vermaak ZA, Freiman I et al. Emergence of multiply-resistant Pneumococci. *N Engl J Med* 1978; 299:735-9.
4. Fenoll A, Jado I, Vicioso D, Pérez A, Casal J. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antibiotic resistance in Spain: update (1990 to 1996). *J Clin Microbiol* 1998; 36:3447-54.
5. Liñares J, Tubau F, Dominguez MA. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Spain: An overview of the 1990s en *Streptococcus pneumoniae*. Nueva York: Ann Liebert Inc; 2000.
6. Pallares R, Fenoll A, Liñares J. The Spanish Pneumococcal Infection Study Network. The epidemiology of antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* and the clinical relevance of resistance to cephalosporins, macrolides and quinolones. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 22:S15-24.
7. Doerm GV, Richter SS, Miller A, Miller N, Rice C, Heilmann K, Beekmann S. Antimicrobial resistance among *Streptococcus pneumoniae* in United States: have we begun to turn the corner on resistance to certain antimicrobial classes? *Cli Infect Dis* 2005; 41: 139-48.
8. Oteo J, Lazaro E, de Abajo FJ, Baquero F, Campos J; Spanish Members of the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. Trends in Antimicrobial Resistance in 1968 Invasive *Streptococcus pneumoniae* Strains Isolated in Spanish Hospitals (2001 to 2003): Decreasing Penicillin Resistance in Children's Isolates. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5571-7.

9. Sloas MM, Barret FF, Chesney PJ, English BK, Hill BC, Tenover FC et al. Cephalosporin treatment failure in penicillin and cephalosporin resistant *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11:662-6.
10. Leggiadro RJ, Barret FF, Chesney PJ, Davis Y, Tenover FC. Invasive pneumococci with high level penicillin and cephalosporin resistance at a mid-south children's hospital. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13:320-2.
11. Viladrich PF, Gudiol F, Liñares J, Pallarés R, Sabaté I, Rufí G et al. Evaluation of vancomycin for therapy of adult pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35:2467-72.
12. Martinez-Lacasa J, Cabellos C, Martos A, Fernandez A, Tubau F, Viladrich PF et al. Experimental study of the efficacy of vancomycin, rifampicin and dexamethasone in the therapy of pneumococcal meningitis. *J Antimicrobial Chemother* 2002; 49:507-13.
13. Rodriguez-Cerrato V, McCoig CC, Saavedra J, Michelow IC, Hardy RD, Iglehart J et al. Garenoxacin (BMS-284756) and moxifloxacin in experimental meningitis by vancomycin tolerant pneumococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:211-5.
14. Nau R, Kaye K, Sachdeva M, Sande ER, Tauber MG et al. Rifampin for therapy of experimental pneumococcal meningitis in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:1186-9.
15. Kaplan SL. Management of pneumococcal meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21:589-91.
16. Norrby SR. Neurotoxicity of carbapenem antibiotics: consequences for their use in bacterial meningitis. *J Antimicrobial Chemother* 2000; 45:5-7.
17. Arrieta A. Use of meropenem in the treatment of serious infections in children: review of the literature. *Clin Infect Dis* 1997; S207-12.
18. Dagan R, Velghe L, Rodda JL, Klugman KP. Penetration of meropenem into the cerebrospinal fluid of patients with inflamed meninges. *J Antimicrobial Chemother* 1994; 34:175-9.
19. Schmutzhard E, Williams KJ, Vukmirovits G, Chemlik V, Pfausler B, Featherstone A. A randomized comparison of meropenem with cefotaxime or ceftriaxone for the treatment of bacterial meningitis in adults.

- Meropenem Meningitis Study Group. *J Antimicrobial Chemother* 1995; 36 Suppl A:85-97.
20. Odio CM, Puig JR, Feris JM, Khan WN, Rodriguez WJ, McCracken GH, Bradley JD. Prospective, randomized, investigator-blinded study of the efficacy and safety of meropenem vs. cefotaxime therapy in bacterial meningitis in children. Meropenem Study Group. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18:581-90.
21. Fukasawa M, Sumita Y, Harabe ET, Tanio T, Nouda H, Kohzuki T et al. Stability of meropenem and effect of 1 $\beta$ -methyl substitution on its stability in the presence of renal dehydropeptidase I. *J Antimicrobial Chemother* 1992; 36:1577-9.
22. Gerber CM, Cottagnoud M, Neftel KA Täuber MG, Cottagnoud P. Meropenem alone and in combination with vancomycin in experimental meningitis caused by a penicillin-resistant pneumococcal strain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18:886-70.
23. Friedland IR, Paris M, Ehrett S, Hickey S, Olsen K, McCracken JR. Evaluation of antimicrobial regimens for treatment of experimental penicillin and cephalosporin resistant pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37:1630-6.
24. Cottagnoud P, Cottagnoud M, Acosta F, Flatz L, Kühn, Stucki A, Entenza J. Meropenem prevents levofloxacin induced resistance in penicillin resistant pneumococci and acts synergistically with levofloxacin in experimental meningitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22:656-662.
25. Nairn K, Shepherd GL, Edwards JR. Efficacy of meropenem in experimental meningitis. *J Antimicrobial Chemother* 1995; 36 Suppl A:73-84.
26. Watson DA, Musher DM. A brief history of the pneumococcus in biomedical research. *Semin Respir Infect* 1999; 14:198-208.
27. Austrian R. Neumococos. En: Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS. *Tratado de Microbiología*. 4<sup>a</sup> ed. Barcelona: Masson; 1996. p.495-503.
28. Murray PR, Rosenthal KJ, Fkaller. *Microbiología Médica*. 5<sup>a</sup> ed. Madrid: Elsevier Mosby; 2006. p.252-8.

29. Falcó V. Infecciones por neumococo. *Medicine* 2006; 9:3266-73.
30. Kenneth J, Ray CG. *Microbiología Médica*. 4ª ed. Mexico: Mc.Graw Hill; 2005. p. 314-7
31. Tuomanen E, Austrian R, Masure HR. Pathogenesis of pneumococcal meningitis. *New Engl J Med* 1995; 332:1280-4.
32. Tuomanen E, Tomasz A, Hengstler B, Zak O. The relative role of bacterial cell wall and capsule in the induction of inflammation in pneumococcal meningitis *J Infect Dis* 1985; 151:535-40.
33. Orihuela CJ, Fillon S, Smith-Sielicki SH, El Kasmi KC, Gao G, Soulis K et al. Cell wall-mediated neuronal damage in early sepsis. *Infect Immun* 2006; 74:3783-9.
34. Boulnois GJ. Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *J Gen Microbiol* 1992; 138:249-59.
35. Friedland IR, Paris MM, Hickey S, Shelton S, Olsen K, Paton JC, McCracken GH. The limited role of pneumolysin in the pathogenesis of pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* 1995; 172:805-9.
36. Ekdahl K, Ahlinder I, Hansson HB, Melander E, Molstad S, Soderstrom M et al. Duration of nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: experiences from the South Swedish Pneumococcal Intervention Project. *Clin Infect Dis* 1997; 25:1113-7.
37. Robinson KA, Baughman W, Rothrock G, Barrett NL, Pass M, Lexau C et al. Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in the United States, 1995-1998: Opportunities for prevention in the conjugate vaccine era. *JAMA* 2001 285:1729-35.
38. Reinert RR, Haupts S, van der Linden M, Heeg C, Cil MY, Al-Lahham A et al. Invasive pneumococcal disease in adults in North-Rhine Westphalia, Germany, 2001-2003. *Clin Microbiol Infect* 2006; 11:985-91.
39. Jefferson T, Ferroni E, Curtale F, Giogi Rossi P, Borgia P. *Streptococcus pneumoniae* in western Europe: serotype distribution and incidence in children less than 2 years. *Lancet Infect Dis* 2006; 6:405-10.
40. Domínguez A, Salleras L, Fedson DS, Izquierdo C, Ruiz L, Ciruela P et al. Effectiveness of pneumococcal vaccination for elderly people in Catalonia, Spain: a case-control study. *Clin Infect Dis* 2005; 40:1250-7.

41. Calbo E, Diaz A, Canadell E, Fabrega J, Uriz S, Xercavins M et al. Spanish Pneumococcal Infection Study Network. Invasive pneumococcal disease among children in a health district of Barcelona: early impact of pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12:867-72.
42. Poehling KA, Talbot TR, Griffin MR, Craig AS, Whitney CG, Zell E et al. Invasive pneumococcal disease among infants before and after introduction of pneumococcal conjugate vaccine. *JAMA* 2006; 295:1668-74.
43. Grau I, Pallares R, Tubau F, Schulze MH, Llopis F, Podzamczar D et al. Spanish Pneumococcal Infection Study Network. Epidemiologic changes in bacteriemic pneumococcal disease in patients with human immunodeficiency virus in the era of highly active antiretroviral therapy. *Arch Intern Med* 2005; 165:1533-40.
44. Heffernan RT, Barret NL, Gallagher KM, Hadler JL, Harrison LH, Reingold AL et al. Declining incidence of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections among persons with AIDS in an era of highly active antiretroviral therapy, 1995-2000. *J Infect Dis* 2005; 191:2038-45.
45. Kyaw MH, Rose CE, Fry AM, Singleton JA, Moore Z, Zell ER et al. The influence of chronic illnesses on the incidence of invasive pneumococcal disease in adults. *J Infect Dis* 2005; 192:377-86.
46. Fenoll A, Jado I, Vicioso D, Berrón S, Yuste JE. *Streptococcus pneumoniae* in children in Spain: 1990-1999. *Acta Paediatr* 2000; Suppl 435:44-50.
47. Novak R, Tuomanen E. Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Semin Respir Infect* 1999; 14:209-17.
48. Tuomanen EI. Pathogenesis of pneumococcal inflammation: otitis media. *Vaccine* 2001; 19:S38-S40.
49. Kyaw MH, Lynfield R, Schaffner W, Craig AS, Hadler J, Reingold A et al. Effect of the introduction of the pneumococcal conjugate vaccine on drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *N Engl J Med* 2006; 354:1455-63.
50. Guillemot D, Carbon C, Balkau B, Gelsin P, Lecoeur H, Vauzelle-Kervroedan F et al. Low dosage and long treatment duration of beta-

- lactam: risk factors for carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. J Am Med Assoc 1998; 279:365-70.
51. Goldstein EJ, Garabedian-Ruffalo S. Widespread use of fluoroquinolones versus emerging resistance in pneumococci. Clin Infect Dis 2002; 35: 1505-11.
  52. Bremon A, Ruiz Tovar M, Gorricho B, de Torres P, Rodríguez R. Non-hospital consumption of antibiotics in Spain: 1987-1997. J Antimicrob Chemother 2000; 45:395-400.
  53. Garau J. Treatment of drug-resistant pneumococcal pneumonia. Lancet Infect Dis 2002; 2:404-15.
  54. Klugman KP. Pneumococcal resistance to antibiotics. Clin Microbiol Rev 1990; 3:171-96.
  55. Fenoll A, Asensio G, Jado I, Berron S, Camacho MT, Ortega M et al. Antimicrobial susceptibility and pneumococcal serotypes. J Antimicrob Chemother 2002; 50 (Suppl. S2):13-9.
  56. Baquero F, Garcia Rodriguez JA, Garcia de Lomas J, Aguilar L and the Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. Antimicrobial resistance of 1113 *Streptococcus pneumoniae* isolates from patients with respiratory tract infections in Spain: results of a 1-year (1996-1997) multicenter surveillance study. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43:357-359.
  57. Rieux V, Carbon C, Azoulay-Dupuis V. Complex relationship between acquisition of beta-lactam resistance and loss of virulence in *Streptococcus pneumoniae*. J Infect Dis 2001; 184:66-72.
  58. Azoulay-Dupuis E, Rieux V, Muffat-Joly J, Bedos P, Valle E, Rivier R et al. Relationship between capsular type, penicillin susceptibility, and virulence of human *Streptococcus pneumoniae* isolates in mice. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44:1575-7.
  59. Pallares R, Liñares J, Vadillo M, Cabellos C, Manresa F, Viladrich PF et al. Resistance to penicillin and cephalosporin and mortality from severe pneumococcal pneumonia in Barcelona. Spain. N Engl J Med 1995; 333:474-80.
  60. Liñares J, Pallares R, Alonso T, Perez JL, Ayats J, Gudiol F et al. Trends in antimicrobial resistance of clinical isolates of *Streptococcus*

- pneumoniae* in Bellvitge Hospital, Barcelona, Spain (1979-1990). Clin Infect Dis 1992; 15:99-105.
61. Gay K, Baughman W, Miller Y, Jackson D, Whitney CG, Schuchat A et al. The emergence of *Streptococcus pneumoniae* resistant to macrolide antimicrobial agents: A 6 year population-based assessment. J Infect Dis 2000; 182:1417-24.
62. Felmingham D, Grunemberg RN. The Alexander Project 1996-1997: latest susceptibility data from this international study of bacterial pathogens from community-acquired lower respiratory tract infections. J Antimicrob Chemother 2000; 45:191-203.
63. Perez Trallero E, Fernandez Mazarrasa C, Garcia Rey C, Bouza E, Aguilar L, Garcia de Lomas J et al. Antimicrobial susceptibilities of 1684 *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* isolates and their ecological relationships: results of a 1-year (1998-1999) multicenter surveillance study in Spain. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45:3334-40.
64. Chen DJ, McGeer A, de Azavedo JC, Low DE. Decreased susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones in Canada. New Engl J Med 1999; 341:233-9.
65. Liñares J, de la Campa AG, Pallares R. Fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. New Engl J Med 1999; 341:1546-7.
66. Williams RJ, Heymann DL. Containment of antimicrobial resistance. Science 1998; 279:1553-4.
67. Tankovic J, Perichon B, Duval J, Courvalin P. Contribution of mutations in *gyrA* and *par C* genes to fluoroquinolone resistance of mutants of *Streptococcus pneumoniae* obtained in vivo and in vitro. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40:2505-10.
68. Ferrandiz MJ, Ardanuy C, Linares J, Garcia Arenzana JM, Cercenado E, Fleites A et al. New mutations and horizontal transfer of *rpoB* among rifampin-resistant *Streptococcus pneumoniae* from four Spanish hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49:2237-45.
69. Vila J, Garcia E. *Streptococcus pneumoniae*. Mecanismos de resistencia. Evolución de la sensibilidad. Estudios multicéntricos de participación nacional. En: Alvarez Lerma F. Problemática actual en el tratamiento de

- infecciones por bacterias grampositivas en pacientes hospitalizados. Pfizer; 2004. p. 23-41.
70. Marco F. Resistencia bacteriana. Aspectes generals. En: Ruiz J. Antimicrobians. Barcelona: Societat Catalana de Biologia; 2004. vol 55. p.11-8.
71. Ruiz J, Simarro E, Gomez J. Resistencia y tratamiento de *Streptococcus pneumoniae*. Enferm Infecc Microbiol Clin 2001; 19:191-5.
72. Hakenbeck R, Briese T, Laible G, Martin C, Schuster C. Penicillin-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae*: alterations during development of intrinsic penicillin resistance. J Chemoter 1991; 3:86-90.
73. Dowson CG, Hutchison A, Brannigan JA, George RC, Hansman D, Linares J et al. Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86:8842-6.
74. Hakenbeck R, Konig A, Kern I, van der Linden M, Keck W, Billot-Klein D et al. Acquisition of five high-MR penicillin-binding protein variants during transfer of high-level betalactam resistance from *Streptococcus mitis* to *Streptococcus pneumoniae*. J Bacteriol 1998; 180:1831-40.
75. Tuomanen E, Pollack H, Parkinson A, Davidson M, Facklam R, Rich R et al. Microbiological and clinical significance of a new property of defective lysis in clinical strains of pneumococci. J Infect Dis 1988; 158:36-43.
76. Barcus VA, Ghanekar K, Yeo M, Coffey TJ, Dowson CG. Genetics of high level penicillin resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. FEMS Microbiol Lett 1995; 126:299-303.
77. Smith AM, Klugman KP. Alterations in PBP 1A essential for high-level penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 1329-33.
78. Hansman D, Bullen MM. A resistant pneumococcus. The Lancet 1967; 2: 264-5.
79. Appelbaum PC. World-wide development of antibiotic resistance in pneumococci. Eur J Clin Microbiol 1987; 6:367-77.
80. Muñoz R, Coffey TJ, Daniels M, Dowson CG, Laible G, Casal J et al. Intercontinental spread of a multiresistant clone of serotype 23F *Streptococcus pneumoniae* J Infect Dis 1991;164:302-6.

81. Tomasz A. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Clin Infect Dis 1997; 24:S85-S88.
82. Romero J. Infecciones causadas por *Streptococcus pneumoniae*. En: Picazo JJ, Romero J. Infecciones por grampositivos. Centro de Estudios Ciencias de la Salud; 1996. p.95-111.
83. Casal J. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*; serotype distribution of penicillin-resistant strains in Spain. Antimicrob Agents Chemother 1982; 22:222-5.
84. Bruinsma N, Kristinsson KG, Bronzwaer S, Schrijnemakers P, Degener J, Tiemersma E et al; European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). Trends of penicillin and erythromycin resistance among invasive *Streptococcus pneumoniae* in Europe. J Antimicrob Chemother 2004; 54: 1045-50.
85. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twelfth informational supplement, M 100-S12. Wayne, PA, USA, 2002.
86. Muñoz R, Dowson CG, Daniels M, Coffey TJ, Martin C, Hakenbeck R et al. Genetics of resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol 1992; 6: 2461-5.
87. Coffey TJ, Daniels M, McDougal LK, Dowson CG, Tenover FC, Spratt BG. Genetic analysis of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with high-level resistance to expanded-spectrum cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39:1306-13.
88. John CC. Treatment failure with use of a third-generation cephalosporin for penicillin-resistant pneumococcal meningitis: case report and review. Clin Infect Dis 1994; 18:188-93.
89. Catalán MJ, Fernández JM, Vázquez A, Varela de Seijas E, Suárez A, et al. Failure of cefotaxime in the treatment of meningitis due to relatively resistant *S. pneumoniae*. Clin Infect Dis 1994; 18: 766-9.
90. Liñares J, Tubau F. Resistencia a cefalosporinas en infecciones por *Streptococcus pneumoniae*. Med Clin 1998; 110 (Suppl.1): 21-24.
91. Reinert RR, Reinert S, van der Linden M, Cil MY, Al-Lahham A, Appelbaum P. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*

- in eight European countries from 2001 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2903-13.
92. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Lexau C, Reingold A et al. Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *N Engl J Med* 2000; 343:1917-24.
93. Draghi DC, Jones ME, Sahm DF, Tillotson GS. Geographically-based evaluation of multidrug resistance trends among *Streptococcus pneumoniae* in USA: findings of the FAST surveillance initiative (2003-2004). *Int J Antimicrob Agents* 2006; 8:525-31.
94. Schumath A, Robinson K, Wenger JD, Harrison LH, Farley M, Reingold AL et al. Bacterial meningitis in the United States in 1995. *N Engl J Med* 1997; 337:970-6.
95. Van de Beek D, de Gans J, Tunkel AR, Wijdicks E. Community-acquired bacterial meningitis in adults. *N Engl J Med* 2006; 354:44-53.
96. Peltola H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: Global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 302-17.
97. Kyaw MH, Christie P, Jones IG, Campbell H. The changing epidemiology of bacterial meningitis and invasive non-meningitic bacterial disease in Scotland during the period 1983-99. *Scand J Infect Dis* 2002; 34:289-98.
98. Casado Flores J, Fenoll A, Aristegui Fernandez J, Rodrigo De Liria C, Martín Sánchez JM et al. Grupo para el Estudio de la Meningitis Neumocócica. Meningitis neumocócica en niños españoles: incidencia, serotipos y resistencia antibiótica. Estudio prospectivo multicéntrico. *An Esp Pediatr* 2002; 57: 295-300.
99. Pineda V, Fontanals D, Larramona H, Domingo M, Anton J, Segura F. Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in children in an area of Barcelona, Spain. *Acta Paediatr* 2002; 91:1251-6.
100. Venetz I, Schopfer K, Muhlemann K. Paediatric, invasive pneumococcal disease in Switzerland, 1985–1994. Swiss Pneumococcal Study Group. *Int J Epidemiol* 1998; 27: 1101-4.

101. Von Kries R, Siedler A, Schmitt HJ, Reinert RR. Proportion of invasive pneumococcal infections in German children preventable by pneumococcal conjugate vaccines. *Clin Infect Dis* 2000; 31:482-7.
102. Robinson KA, Baughman W, Rothrock G, Barret NL, Pass M, Lexau C et al. Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in the United States, 1995-1998: Opportunities for prevention in the conjugate vaccine era. *JAMA* 2001; 285:1729-35.
103. Domínguez A, Salleras L, Cardenosa N, Ciruela P, Carmona G, Martínez A et al. The epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* disease in Catalonia (Spain). A hospital-based study. *Vaccine* 2002; 26: 2989-94.
104. Sleeman K, Knox K, George R, Miller E, Waight P, Griffiths D et al. Public Health Laboratory Service; Oxford Pneumococcal Surveillance Group. Invasive pneumococcal disease in England and Wales: vaccination implications. *J Infect Dis* 2001; 183: 239-46.
105. Goetghebuer T, West TE, Wermenbol V, Cadbury AL, Milligan P, Lloyd-Evans N et al. Outcome of meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type b in children in The Gambia. *Trop Med Int Health* 2000; 5: 207-13.
106. Van de Beek D, de Gans J, Spanjaard L, Weisfelt M, Reitsma JB, Vermeulen M. Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med* 2004; 351:1849-59.
107. Weisfelt M, Van de Beek D, Spanjaard L, Reitsma JB, de Gans J. Community-acquired bacterial meningitis in older people. *J Am Geriatr Soc* 2006; 54:1500-7.
108. Auburtin M, Porcher R, Bruneel F, Scanvic A, Trouillet JL, Bedos JP et al. Pneumococcal meningitis in the intensive care unit. Prognostic factors of clinical outcome in a series of 80 cases. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:713-7.
109. Casado Flores J, Aristegui Fernandez J, Rodrigo De Liria C, Martín Sánchez JM, Fernandez C. Spanish pneumococcal meningitis study group. Clinical data and factors associated with poor outcome in pneumococcal meningitis. *Eur J Pediatr* 2006; 165:285-9.

110. Gudiol Munté F, Rufí Rigau G, Fernández Viladrich P, Graus Ribas F, Saiz Hinarejos A. Infecciones del sistema nervioso central. En: Farreras P, Rozman C, eds. Medicina Interna. 15 ed. Madrid: Elsevier; 2004. p. 1423-1434.
111. Tunkel AR, Scheld WS. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6: 118-36.
112. Koedel U, Scheld WM, Pfister HW. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *The Lancet Infect Dis* 2002; 2: 721-36.
113. Leib SL, Täuber MG. Pathogenesis of bacterial meningitis. *Infect Dis Clin North Am* 1999; 13:527-48.
114. Ring A, Weiser J, Tuomanen E. Pneumococcal trafficking across the blood brain barrier. *J Clin Invest* 1998; 102:347-60
115. Ernst JD, Decazes JM, Sande MA. Experimental pneumococcal meningitis: role of leukocytes in pathogenesis. *Infect Immun* 1983; 41:275-9.
116. Buster BL, Weintrob AC, Townsend GC, Scheld WM. Potential role of nitric oxide in the pathophysiology of experimental bacterial meningitis in rats. *Infect Immun* 1995; 63:3835-9.
117. Paul R, Lorenzl S, Koedel U, Sporer B, Vogel U, Frosch M et al. Matrix metalloproteinases contribute to the blood brain barrier disruption during bacterial meningitis. *Ann Neurol* 1998; 44:592-600.
118. Tauber MG, Khayam Bashi H, Sande MA. Effects of ampicillin and corticosteroids on brain water content, cerebrospinal fluid pressure, and cerebrospinal fluid lactate levels in experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* 1985; 151:528-34.
119. Nau R, Soto A, Bruck W. Apoptosis of neurons in the dentate gyrus in humans suffering from bacterial meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58:265-74.
120. Zysk G, Brück W, Gerber J, Brück Y, Prange HW, Nau R. Anti-inflammatory treatment influences neuronal apoptotic cell death in the dentate gyrus in experimental pneumococcal meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55:722-28.
121. Quagliarello V, Scheld WM. Bacterial meningitis: Pathogenesis, pathophysiology, and progress. *N Engl J Med* 1992; 327:864-72

122. Chan PH, Fishman RA, Wesley MA, Longar S. Pathogenesis of vasogenic edema in focal cerebral ischemia. Role of superoxide radicals. *Adv Neurol* 1990; 52:177-83.
123. Tureen JH, Dworkin RJ, Kennedy SL, Sachdeva M, Sande MA. Loss of cerebrovascular autoregulation in experimental meningitis in rabbits. *J Clin Invest* 1990; 85:577-81.
124. Guerrero Sánchez F, Brun Romero F, Girón González A. Antiinfecciosos de empleo en infecciones del sistema nervioso central. *Medicine* 2003; 8:5254-9.
125. Chowdhury MH, Tunkel AR. Antibacterial agents in infections of the central nervous system. *Infect Dis Clin North Am* 2000; 14:391-408.
126. Lutsar I, McCracken GH Jr, Friedland IR. Antibiotic pharmacodynamics in cerebrospinal fluid. *Clin Infect Dis* 1998; 27:1117-27.
127. Andes D, Craig WA. Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 19: 261-8.
128. Lebel MH, McCracken GH Jr. Delayed cerebrospinal fluid sterilization and adverse outcome of bacterial meningitis in infants and children. *Pediatrics* 1989; 83: 161-7.
129. Friedland IR, Klugman KP. Failure of chloramphenicol therapy in penicillin resistant pneumococcal meningitis. *Lancet* 1992; 339:405-8.
130. Viladrich PF, Cabellos C, Pallares R, Tubau F, Martínez-Lacasa J, Liñares J et al. High doses of cefotaxime in the treatment of adults meningitis due to *S. pneumoniae* with decreased susceptibilities to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:218-20.
131. Paris MM, Ramilo O, McCracken GH Jr. Management of meningitis caused by penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2171-5.
132. American Academy of Pediatrics, Committee of Infectious Diseases. Therapy for children with invasive pneumococcal infections. *Pediatrics* 1997; 99:289-99.

133. Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, Kaufman BA, Roos KL, Scheld WM et al. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 1267-84.
134. Friedland IR, McCracken G. *Streptococcus pneumoniae*. En: Yu VL, Merigan TC, Berniere SL. Antimicrobial therapy and vaccines. Williams Wilkins; 1999. p. 433-43.
135. Garau J, Martínez-Lacasa X. Resistencia de *Streptococcus pneumoniae* a los betalactámicos y manejo de la meningitis neumocócica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21:3-6.
136. Cabellos C, Navas E, Martínez J, Gatell JM. Infecciones del sistema nervioso central. *Protocolos clínicos SEIMC* 2001; 2:3-11.
137. Nau R, Wellmer A, Soto A, Koch K, Schneider O, Schmidt H et al. Rifampin reduces early mortality in experimental *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *J Infect Dis* 1999; 179:1557-60.
138. Kleiman MD, Weinberg GA, Reynolds JK, Allen SD. Meningitis with beta-lactam resistant *Streptococcus pneumoniae*: the need for early repeat lumbar puncture. *Pediatr Infect Dis J* 1993; 12: 782-4.
139. Barakett V, Lesage F, Delisle F, Richard G, Petit JC. Killing kinetics of meropenem against penicillin-resistant pneumococci. *J Antimicrob Chemother* 1996; 38:1085-9.
140. van de Beek D, Hensen EF, Spanjaard L, de Gans J, Enting RH, Dankert J. Meropenem susceptibility of *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae* from meningitis patients in The Netherlands. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40:895-7.
141. Klugman KP, Dagan R, Meropenem Meningitis Study Group: Randomized comparison of meropenem with cefotaxime for treatment of bacterial meningitis. *J Antimicrob Chemother* 1995; 39:1140-6.
142. John CC, Aouad G, Berman B, Schreiber JR. Successful meropenem treatment of multiply resistant pneumococcal meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16:1009-11.
143. Drusano GL, Lode H, Edwards R. Meropenem: clinical response in relation to *in vitro* susceptibility. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6:185-94.
144. Cottagnoud P, Pfister M, Cottagnoud M, Acosta F, Tauber MG. Activities of ertapenem, a new long-acting carbapenem, against

- penicillin-sensitive or resistant pneumococci in experimental meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:1943-7.
145. Lutsar I, Friedland IR, Wubbel L, McCoig CC, Jafri HS, Winston NG et al. Pharmacodynamics of gatifloxacin in cerebrospinal fluid in experimental cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2650-5.
146. Ostergaard C, Sorensen TK, Knudsen JD, Frimodt-Moller N. Evaluation of moxifloxacin, a new 8-methoxyquinolone, for treatment of meningitis caused by a penicillin-resistant pneumococcus in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1706-12.
147. Smirnov A, Wellmer A, Gerber J, Maier K, Henne S, Nau R. Gemifloxacin is effective in experimental pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:767-70.
148. McCoig CC, Wubbel L, Jafri HS, Lutsar I, Bastero R, Olsen K et al. Pharmacodynamics of trovafloxacin in experimental pneumococcal meningitis: Basis for dosage selection in children with meningitis. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43:683-8.
149. Saez-Llorens X, McCoig C, Feris JM, Vargas SL, Klugman KP, Hussey GD et al. Quinolone treatment for pediatric bacterial meningitis: a comparative study of trovafloxacin and ceftriaxone with or without vancomycin. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21:14-22.
150. Cottagnoud P, Tauber MG. Fluoroquinolones in the treatment of meningitis. *Curr Infect Dis Rep* 2003; 5:329-36.
151. Canton R, Loza E, Morosini MI. ¿Necesitamos una nueva clase de antibióticos para el tratamiento de las infecciones por microorganismos grampositivos? *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 5(3):1-13.
152. Cottagnoud P, Gerber CM, Acosta F, Cottagnoud M, Neftel K, Tauber MG. Linezolid against penicillin-sensitive and resistant pneumococci in the rabbit meningitis model. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46:981-5.
153. Faella F, Pagliano P, Fusco, Attanasio V, Conte M. Combined treatment with ceftriaxone and linezolid of pneumococcal meningitis: a case series including penicillin-resistant strain. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12:391-4.

154. Cottagnoud P, Pfister M, Acosta F, Cottagnoud M, Flatz L, Kühn F et al. Daptomycin is highly efficacious against penicillin-resistant and penicillin and quinolone-resistant pneumococci in experimental meningitis. *J Antimicrob Chemother* 2004; 48:3928-33.
155. McIntyre PB, Berkey CS, King SM, Schaad UB, Kilpi T, Kanra GY et al. Dexamethasone as adjunctive therapy in bacterial meningitis: a meta-analysis of randomized clinical trials since 1988. *JAMA* 1997; 278: 925-31.
156. De Gans J, van de Beek D. Dexamethasone in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med* 2002; 347:1549-56.
157. Weisfelt M, van de Beek D, de Gans J. Dexamethasone treatment in adults with pneumococcal meningitis: risk factors for death. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006; 10:1-6.
158. Leib SL, Heimgartner C, Bifrare YD, Loeffler JM, Tauber MG. Dexamethasone aggravates hippocampal apoptosis and learning deficiency in pneumococcal meningitis in infant rats. *Pediatr Res* 2003; 54: 353–7.
159. Paris MM, Hickey SM, Uscher MI, Shelton S, Olsen KD, McCracken GH Jr. Effect of dexamethasone on therapy of experimental penicillin- and cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:1320-4.
160. Cabellos C, Martínez-Lacasa J, Martos A, Tubau F, Fernández A, Viladrich PF et al. Influence of dexamethasone on efficacy of ceftriaxone and vancomycin therapy in experimental pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:2158-60.
161. Weisfelt M, de Gans J, van der Poll T, van der Beek D. Pneumococcal meningitis in adults: new approaches to management and prevention. *Lancet Neurol* 2006; 5:332-42.
162. Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. London: Methuen; 1959.
163. Zak O, Sande MA. Handbook of animal models of infection. San Diego: Academic Press; 1999.
164. Bergeron MG. A review of models for therapy of experimental infections. *Scand J Infect Dis* 1978; 14 (Suppl):189-206.

165. Koedel V, Pfister HW. Models of experimental bacterial meningitis. Role and limitations. *Infect Dis Clin North Am* 1999; 13:549-77.
166. Cabellos C, Pachón J, Almirante B. Modelo de meningitis. En: Miró JM, Gatell JM, eds. Modelos experimentales de patología infecciosa. Monografías Dr. Antonio Esteve. Barcelona, Doyma, 2000; 71-9.
167. Moxon ER, Smith AL, Averill DR, Smith DH. *Haemophilus influenzae* meningitis in infant rats after intranasal inoculation. *J Infect Dis* 1974; 129:154-62.
168. Dacey RG, Sande MA. Effect of probenecid on cerebrospinal fluid concentrations of penicillin and cephalosporin derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* 1974; 6:437-41.
169. Täuber MG, Zwhlen A. Animals models for meningitis. *Methods Enzymol* 1994; 235:93-106.
170. Park WS, Chang YS, Lee M. Effect of induced hyperglycemia on brain cell membrane function and energy metabolism during the early phase of experimental meningitis in newborn piglets. *Brain Res* 1998; 398:195-203.
171. Maiques JM, Domenech A, Cabellos C, Fernández A, Ribes S, Tubau F et al. Evaluation of antimicrobial regimens in a guinea-pig model of meningitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Infect* 2007; 9:435-41.
172. Winter A, Marwick S, Osborne M, Comis S, Stephen J, Tarlow M. Ultrastructural damage to the organ of Corti during acute experimental *Escherichia coli* and pneumococcal meningitis in guinea pigs. *Acta Otolaryngol* 1996; 116:401-7.
173. Fitoussi F, Doit C, Benali K, Bonacorsi S, Gelsin P, Bingen E. Comparative in vitro killing activities of meropenem, imipenem, ceftriaxone, and ceftriaxone plus vancomycin at clinically achievable cerebrospinal fluid concentrations against penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from children with meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:942-4.
174. Garcia Sanchez E, Fresnadillo Martínez MJ, Blazquez de Castro AM. Carbapenems. *Medicine* 1998; 7:3728-35.

175. Fish DN. Carbapenems. En: Yu VL, Meritan TC, Cerniere SL. Antimicrobial therapy and vaccines. Baltimore: Williams Wilkins; 1999. p. 690-703.
176. Marín M, Gudiol Francesc. Antibióticos betalactámicos. Enferm Infecc Microbiol Clin 2003; 21:42-55.
177. Tubau F, Cabellos C, Liñares J. Lack of correlation between in vitro and in vivo studies of combinations of rifampin plus vancomycin or  $\beta$ .lactam antibiotics against *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40:1573-4.
178. Barakett V, Lesage D, Delisle F, Vergez P, Petit JC. Killing kinetics of vancomycin and rifampin tested alone and in combination against penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1993; 12: 69-71.
179. Honorato Pérez J, Escolar Jurado M, García Quetglas E, Azanza Perea JR. Fármacos antituberculosos. Medicine 1998; 7:3931-42.
180. Klugman KP, Friedland IR, Bradleym JS. Bacterial activity against cephalosporinresistant *Streptococcus pneumoniae* in cerebrospinal fluid of children with acute bacterial meningitis. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39:1988-92.
181. Morris AB, Kanyok P, Scott J, Peloquin A, Berning E. Rifamycins. En: Yu VL, Meritan TC, Cerniere SL. Antimicrobial therapy and vaccines. Baltimore: Williams Wilkins; 1999. p. 901-63.
182. Van Tilburg PM, Bogaert D, Sluijter M, Jansz AR, de Groot R, Hermans PW. Emergence of rifampin-resistant *Streptococcus pneumoniae* as a result of antimicrobial therapy for penicillin-resistant strains. Clin Infect Dis. 2001; 33: e93-6.
183. Meier PS, Utz S, Aebi S, Muhlemann K. Low-level resistance to rifampin in *Streptococcus pneumoniae* Antimicrob Agents Chemother 2003; 47:863-8.
184. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Fifth Edition: Approved Standard M7-A5. NCCLS, Villanova, PA, USA, 2000.

185. Shimojo N, Naka K, Nakajima C, Yoshikawa C, Okuda K, Okada K. Teststrip method for measuring lactate in whole blood. *Clin Chem* 1989; 35:1992-4.
186. Duhamel RC, Meezan E, Brendel J. Determination of protein in cerebrospinal fluid, a new method. *J Biochem Biophys Methods* 1981; 5:67-74.
187. Eliopoulos GM, Moellering RC Jr. Antimicrobial combinations. In: Lorian V, ed. *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4th ed. Baltimore: The Williams & Wilkins Co; 1996. p. 330–96.
188. Nau R, Zysk G, Reinert RR, Mergeryan H, Eiffert H, Prange HW. Activity of fosfomicin in a rabbit model of experimental pneumococcal meningitis. *J Antimicrob Chemoter* 1995; 36:997-1004.
189. Cottagnoud P, Acosta F, Cottagnoud M, Tauber MG. Gemifloxacin is efficacious against penicillin resistant and quinolone resistant pneumococci in experimental meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:1607-9.
190. Tarasi A, Dever LL, Tomasz A. Activity of quinupristin/dalfopristin against *Streptococcus pneumoniae* in vitro and in vivo in the rabbit model of experimental meningitis. *J Antimicrob Chemoter* 1997; 39 Suppl A:121-7.
191. Ribes S, Taberner F, Domenech A, Cabellos C, Tubau F, Liñares J et al. Evaluation of ceftriaxone, vancomycin and rifampicin alone and combined in an experimental model of meningitis caused by highly cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* ATCC 51916. *J Antimicrob Chemoter* 2005; 56:979-82.
192. Taüber MG, Sande MA. Principles in treatment of bacterial meningitis. *Am J Med* 1984; 76:224-30.
193. Kim SW, Jin JH, Kang SJ, Jung SI, Kim YS, Kim CK et al. Therapeutic efficacy of meropenem for treatment of experimental penicillin-resistant pneumococcal meningitis 2004. *J Korean Med Sci* 19: 21-6.
194. Gerber J, Pohl K, Sander V, Bunkowski S, Nau R. Rifampin followed by ceftriaxone for experimental meningitis decreases lipoteichoic acid concentrations in cerebrospinal fluid and reduces neuronal damage in

- comparison to ceftriaxone alone. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:1313-17.
195. Marco F, Liñares J, Miró JM. Utilidad de los estudios *in vitro* para seleccionar los estudios *in vivo*. En: Miró JM, Gatell JM, eds. Modelos experimentales de patología infecciosa. Monografías Dr. Antonio Esteve. Barcelona, Doyma, 2000; 11-22.
196. Bradley JS, Garau J, Lode H, Rolston KVI, Wilson SE, Quinn JP. Carbapenems in clinical practice: a guide to their use in serious infection. *Inter J Antimicrob Agents* 1999; 11:93-100.
197. Giron KP, Gross ME, Musher DM, Williams JR, Tharappel RA. *In vitro* antimicrobial effect against *Streptococcus pneumoniae* of adding rifampin to penicillin, ceftriaxone, or 1-ofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:2798-2800.
198. Tubau F, Liñares J, Ardanuy C, Martínez-Lacasa J, Fernández A, Cabellos C et al. Actividad bactericida *in vitro* de diferentes combinaciones de antibióticos frente a *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina y cefotaxima. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1996; 14:590-95.
199. Doit CP, Bonacorsi P, Fremaux AJ, Sissia G, Cohen R, Geslin PL et al. *In vitro* killing activities of antibiotics at clinically achievable concentrations in cerebrospinal fluid against penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolated from children with meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:2655-9.
200. Cormican MG, Erwin ME, Jones RN. Bactericidal activity of cefotaxime, desacetylcefotaxime, rifampin, and various combinations tested at cerebrospinal fluid levels against penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995; 22:119-23.
201. Friedland IR, Paris M, Shelton S, McCracken GH. Time-kill studies if antibiotic combinations against penicillin-resistant and susceptible *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Chemother* 1994; 34:231-7.
202. Kanazawa K, Ueda Y. *In vitro* combined effect of meropenem and various antimicrobial agents against beta-lactamase-nonproducing ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* and penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Jpn J Antibiot* 2005; 58:168-78.

203. Yurtseven T, Suntur BM, Sipahi OR, Büke C, Büke M. Does rifampin and ceftriaxone can be an alternative to vancomycin and ceftriaxone in experimental penicillin and cephalosporin resistant-pneumococcal meningitis? *J Neurol Sci* 2005; 22:29-34.
204. Viladrich PF, Tubau F, Cabellos C, Pallares R, Rufí G, et al. Vancomycin plus rifampin for therapy of adult pneumococcal meningitis. 9th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Berlín, Alemania. Marzo 1999. Abstract nº P616.



## VIII. Anexo



# Experimental study of meropenem in the therapy of cephalosporin-susceptible and -resistant pneumococcal meningitis

E. Force · F. Taberner · C. Cabellos · S. Ribes ·  
A. Domenech · F. Tubau · P. F. Viladrich · F. Gudiol

Received: 25 October 2007 / Accepted: 7 February 2008 / Published online: 2 April 2008  
© Springer-Verlag 2008

**Abstract** Meropenem is a carbapenem antibiotic that is highly active against the pathogens causing meningitis. Results with meropenem in the experimental rabbit model of pneumococcal meningitis have been controversial, and the possible role of renal dehydropeptidase I in meropenem efficacy has been suggested. The aim of this study was to determine the efficacy of meropenem in two meningitis models and the possible influence of the animal model over results. Two strains of *Streptococcus pneumoniae* with different susceptibility to beta-lactams have been used in a guinea pig model and the classical rabbit meningitis model. Meropenem was bactericidal at 6 h in the guinea pig model against both strains with a reduction of  $>4$  log ufc/ml. In the rabbit model it was bactericidal at 6 h against the susceptible strain, but against the resistant 3/8 therapeutical failures were recorded at 6 h, being bactericidal at 24 h. In conclusion, meropenem has shown bactericidal activity in both experimental models. This work emphasises the importance of an adequate election of the animal model for the appropriate development of studies of antimicrobial efficacy. We believe that guinea pig should be considered

the best choice among laboratory animal species when assessing meropenem efficacy.

## Introduction

Despite effective antibiotic therapy, pneumococcal meningitis is still associated with high rates of mortality and permanent sequel. The increasing spread of cephalosporin-resistant strains has made the therapy for pneumococcal meningitis more difficult.

Meropenem is a broad-spectrum carbapenem antibiotic that is highly active against the major bacterial pathogens causing meningitis and penetrates well into the CSF [1]. The limited experience in patients with bacterial meningitis suggests that the use of meropenem may lead to clinical and microbiologic outcomes similar to those of cefotaxime or ceftriaxone, but the number of resistant cases is very small [2–5]. Carbapenems such as imipenem or meropenem demonstrate high activity against pneumococci with different susceptibility patterns to  $\beta$ -lactams [6]. In spite of its high in vitro activity, imipenem is not recommended in the management of bacterial meningitis due to its convulsive potential [7]. Overall, meropenem that is not associated with this collateral effect might represent a good alternative in cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis.

Results with meropenem in the experimental rabbit model of pneumococcal meningitis have been controversial [8, 9], and the possible role of renal dehydropeptidase I (DHP-1) in meropenem efficacy has been suggested. The activity of DHP-1 differs among mammal species: meropenem is relatively stable to the human enzyme, but varies in its stability in many common laboratory animal species [10]. The drug is easily hydrolyzed by rabbits, while it shows greater resistance in guinea pigs. Both animal

---

E. Force · F. Taberner · C. Cabellos (✉) · S. Ribes ·  
A. Domenech · P. F. Viladrich · F. Gudiol  
Laboratory of Experimental Infection,  
Infectious Diseases Service, IDIBELL,  
Hospital Universitari de Bellvitge,  
Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat,  
Barcelona, Spain  
e-mail: ccabellos@csub.scs.es

F. Tubau  
Microbiology Department, IDIBELL,  
Hospital Universitari de Bellvitge, University of Barcelona,  
Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat,  
Barcelona, Spain

models have been used in order to assess the activity of meropenem in experimental meningitis [8, 11].

The aim of this study was to determine the efficacy of meropenem against two *S. pneumoniae* strains with different susceptibility to  $\beta$ -lactams using the rabbit and the guinea pig meningitis models and the possible influence of the animal model over results.

## Materials and methods

### Bacterial strains

Two strains of *S. pneumoniae* isolated from patients with meningitis were used: strain HUB SIII belonging to serotype 3 and HUB 2349 belonging to serotype 23F. MICs and MBCs were determined by the macrodilution method according to CLSI (formerly NCCLS) guidelines [12]. MICs/MBCs (in  $\mu\text{g/ml}$ ) of strain HUB SIII were as follows: penicillin 0.01/0.01 and ceftriaxone 0.01/0.01; meropenem 0.01/0.01 MICs/MBCs (in  $\mu\text{g/ml}$ ) of strain HUB 2349 were as follows: penicillin 4/4, ceftriaxone 2/4 and meropenem 0.5/1.

### In vitro studies

Time-kill curves were performed with glass tubes containing a final volume of 10 ml of cation-adjusted Mueller-Hinton broth with 5% of horse lysed blood. The final inoculum was  $5 \times 10^5$  CFU/ml. For each strain, meropenem was tested for a range of concentrations according to their MICs and their achievable concentration in CSF. Meropenem was tested at concentrations ranging from 1/4 to  $32 \times \text{MIC}$ . Samples were removed at 0, 6 and 24 h of incubation. The detection limit was 10 CFU/ml. Bactericidal effect was defined as a decrease of  $\geq 3$  log CFU/ml of the initial inoculum.

### Guinea pig model

The study was approved by the Ethical Committee for Animal Experiments at the University of Barcelona. The meningitis model described by Maiques et al. [13] based in a wide modification of that of Nairn [11] was used. For all experiments, guinea pigs were challenged in groups of at least eight animals. Hartley female guinea pigs weighing 350–450 g were anaesthetized by a single im injection of a mixture of xilacine: 4 mg/kg (Rompum; Bayer AG, Leverkusen, Germany) and ketamine: 30 mg/kg (Ketolar; Parke-Davis, Prat de Ll., Spain). Without the use of any stereotactic system, a 27-gauge butterfly needle with infusion set was inserted, through the nuchal area, into the cisterna magna. When clear CSF flowed, 100  $\mu\text{l}$  of saline

solution containing  $10^6$  CFU/ml of one of the infecting strains was injected intrathecally, and the butterfly removed. Eighteen hours after inoculation the animals were anaesthetized again, and a baseline CSF sample was taken (0h) by the same procedure as inoculation. A blood sample was collected to assess secondary bacteraemia. Meropenem: 200 mg/kg/6 h (Meronem; AstraZeneca, Madrid, Spain) im was then administered for 24 h. Untreated controls received saline. CSF samples were taken at 3, 6 and 24 h of therapy. The available CSF volume was limited by the small size of guinea pigs, so we arranged two groups in order to have a final  $n \geq 8$  samples for each time point. In one group, CSF samples were taken at 0 and 6 h, and in the other at 3 and 24 h.

### Rabbit model

The rabbit model of meningitis was based on an established protocol [14]. For all experiments, rabbits were challenged in groups of at least eight animals. Two-kilogram female New Zealand white rabbits were anaesthetized im with 35 mg/kg of ketamine and 5 mg/kg of xylazine, and a dental acrylic helmet was affixed to the calvarium; 24 h later, animals were anaesthetized again and placed in a stereotaxic frame. Meningitis was induced using an intracisternal injection of 250  $\mu\text{l}$  of saline solution containing  $10^6$  CFU/ml inoculum of one of the infecting strains. Eighteen hours later, rabbits were anaesthetized with urethane 1.75 g/kg, subcutaneously (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) and thiopental sodium 5 mg/kg, iv (Tiopental; B. Braun Medical S.A., Rubí, Spain), and a baseline CSF sample was taken (0h). A blood sample was collected to assess secondary bacteraemia. Meropenem: 150 mg/kg/6 h iv was then administered for 24 h. Untreated controls received saline. CSF samples were taken at 2, 6 and 24 h of therapy.

### Sample processing

CSF samples were used to determine bacterial counts, lactate and protein concentrations, and antibiotic levels at peak and trough time points. Undiluted cultures and serial ten-fold dilutions were performed at each time point. The lowest bacterial concentration detectable was 10 CFU/ml, so a value of 0.99 log CFU/ml was assigned to sterile culture. Therapeutic failure was defined as an increase in bacterial concentration of at least 1 log CFU/ml compared with a previous count and bacterial re-growth an increase of  $< 1$  log CFU/ml. A therapy was considered bactericidal when a reduction of  $\geq 3$  log CFU/ml was achieved. Lactate concentrations were measured using a Lactate PAP (Biomérieux, France). Protein concentrations were determined

using the Bradford method (Bio-Rad Protein Assay, Germany).

#### Pharmacokinetics

Pharmacokinetic (PK) studies were performed in both models to select dose regimens that result in CSF concentrations similar to those in humans. PK data were compiled from a study of infected guinea pig after a single i.m. dose of 200 mg/kg of meropenem and from a study of infected rabbits after a single i.v. dose of 150 mg/kg of meropenem. Several PK and pharmacodynamic (PD) parameters were determined in serum and CSF: maximum concentration ( $C_{max}$ ), area under the concentration-time curve (AUC), CSF penetration as the comparison of areas under the curve ( $AUC_{CSF}/AUC_{serum}$ ) and time above the MIC of the drug concentration in CSF ( $t > MIC$ ). 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) after determination of antibiotic concentration in blood and CSF samples at the different time points.

#### Antibiotic assays

Meropenem concentrations were measured by agar disc diffusion method [15], using *Bacillus subtilis* ATCC 12432 as assay organism.

#### Statistical analysis

All data were checked for normal distribution (Kolmogorov-Smirnov test). Comparisons between groups were made by using Student's t test.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

#### In vitro killing curves

*Strain HUB SIII* Meropenem at  $1-32 \times MIC$  (0.01–0.32  $\mu g/ml$ ) was bactericidal at 6 h. *Strain HUB 2349*. Meropenem at  $2-4 \times MIC$  (1–2  $\mu g/ml$ ) was bactericidal at 6 h.

#### Pharmacokinetics

Meropenem peak level in serum was  $125.44 \pm 28.22 \mu g/ml$  at 0.30 h in guinea pigs and  $71.30 \pm 24.44 \mu g/ml$  at 0.30 h in rabbits. Pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters

of antibiotics in CSF of guinea pigs and rabbits with pneumococcal meningitis are shown in Table 1.

#### Experimental meningitis in guinea pig

*Strain HUB SIII* Eighteen hours after inoculation, 100% of the animals presented secondary bacteraemia. Mortality at 24 h was 44% (4/9) in the control group and 0% in the therapy group. Table 2 shows the bacterial reduction in CSF at 6 and 24 h; meropenem were bactericidal from 6 h. No therapeutic failures were observed. Antibiotic levels in CSF of animals infected with this strain are summarized in Table 3. After 24 h of infection, CSF inflammatory parameters were decreased in the therapy group compared to the control group, with lactate levels being statistically significant (in mmol/l: meropenem,  $1.48 \pm 0.41$  and control group,  $4.16 \pm 0.65$ ).

*Strain HUB 2349* Eighteen hours after inoculation, 100% of the animals showed secondary bacteraemia. Mortality at 24 h was 0% in the control and therapy group. Table 2 shows the bacterial reduction in CSF at 6 and 24 h; meropenem was bactericidal from 6 h. No therapeutic failures were observed. Antibiotic levels in CSF of animals infected with this strain are represented in Table 3. Meropenem reduced CSF inflammatory parameters in comparison to the control group at 24 h, with lactate levels being statistically significant (in mmol/l: meropenem,  $1.99 \pm 0.33$  and control group,  $3.78 \pm 1.89$ ).

#### Experimental meningitis in rabbits

*Strain HUB SIII* Eighteen hours after inoculation, 63% of the animals presented secondary bacteraemia. Mortality at 24 h was 63% (7/11) in the control group and 0% in the therapy group. Table 4 represents CSF bacterial counts at 0 h and CSF bacterial reduction at 2, 6 and 24 h; meropenem was bactericidal from 6 h. No therapeutic failures were observed. Antibiotic levels in the CSF of animals infected with the HUB SIII strain are summarized in Table 3. Meropenem reduced CSF inflammatory parameters in comparison to the control group at 24 h, with lactate levels being statistically significant (in mmol/l: meropenem,  $1.95 \pm 0.92$  and control group,  $3.62 \pm 0.86$ ).

*Strain HUB 2349* Eighteen hours after the inoculation, 100% of the animals presented secondary bacteraemia. Mortality at 24 h was 62% (five of eight) in the control group and 0% in the therapy group. Initial CSF bacterial concentrations and bacterial decreases at 2, 6 and 24 h of different regimens are summarized in Table 4. After 6 h of

**Table 1** Pharmacokinetics and pharmacodynamic parameters of meropenem in CSF of guinea pigs and rabbits with pneumococcal (resistant strain) meningitis

Animal model	Antibiotic dose <sup>a</sup>	C <sub>max</sub> <sub>CSF</sub> (µg/ml)	AUC <sub>CSF</sub> (µg/h/ml)	Penetration (%)	t > MIC h [%]
Guinea pig	Meropenem (200 mg/kg)	2.76	7.30	5.8	4.02 [67]
Rabbit	Meropenem (150 mg/kg)	4.95	8.82	19.4	5.17 [86]

<sup>a</sup> Antibiotics were administered iv in rabbits, whereas they were injected im in guinea pigs.

C<sub>max</sub>, maximum concentration. C<sub>max</sub> was at 2 h in guinea pig and at 30 min in rabbits

AUC, area under the concentration-time curve

Penetration was calculated as the comparison of areas under the curve (AUC<sub>CSF</sub>/AUC<sub>serum</sub>)

t>MIC, time above the MIC

meropenem therapy, therapeutic failure was present in three of eight animals and bacterial regrowth in the other three animals. Meropenem was bactericidal at 24 h. Antibiotic levels in the CSF of animals infected with the HUB 2349 strain are shown in Table 3. No statistical differences were noted in CSF inflammatory parameters.

## Discussion

In our study, meropenem has shown great efficacy in the guinea pig model of meningitis caused by two pneumococcal strains with different susceptibility to β-lactams. With a CSF penetration of 5.8%, mean peak CSF levels closely related to those obtained in children receiving 20 mg/kg i.v were reached [1]. In efficacy experiments, no therapeutic failures were observed in any animal despite its relatively low levels, especially noted in guinea pigs infected with the penicillin-resistant pneumococcus. T>MIC was more than 100% for the SIII strain, whereas it was about 70% for the HUB 2349 strain. It seems that a value of 70% would be necessary to reach a bactericidal effect when using meropenem in the guinea pig model. The use of this laboratory animal to study meropenem efficacy has been previously reported by Nairn et al [11]. They

assessed meropenem efficacy against several pathogens causing meningitis, including either penicillin-susceptible or penicillin-resistant strains of *S. pneumoniae* in a 10-h experiment. Meropenem at 10 mg/kg/3 h reduced bacterial counts below the level of detection in all guinea pigs infected with penicillin-susceptible strain. In animals inoculated with penicillin-resistant strain, meropenem at 40 mg/kg/3 h sterilised CSF specimens in four of five animals.

Using the rabbit meningitis model, meropenem was effective against the β-lactam susceptible strain. However, in the experiments with the resistant strain, efficacy was delayed, and at 6 h we observed therapeutic failure in three of eight animals and bacterial regrowth in the other three animals. After 24 h, meropenem was bactericidal against both strains, although statistically significant differences were noted among rabbits infected with either the susceptible or the resistant strain (rlog cfu/ml were, respectively:  $-4.32 \pm 0.38$ , and  $-3.36 \pm 1.25$ ;  $p=0.007$ ). CSF meropenem concentrations were similar among rabbits infected with each pneumococcal strain, although slightly lower levels were found at 6 h for the resistant strain. Therapeutic failures and regrowth occurred in the resistant-strain-infected animals. This fact suggests that drug levels very close to MIC might not be high enough to ensure efficacy despite a T>MIC above 85%. In comparison with findings

**Table 2** Initial bacterial concentrations and bacterial killing rates in CSF of guinea pigs with pneumococcal meningitis caused by the HUB SIII strain (MIC: MPN, 0.01 µg/ml) and the HUB 2349 strain (MIC: MPN, 0.5 µg/ml)

Therapy group (dose in mg/kg/day)	HUB SIII strain			HUB 2349 strain		
	initial titres (log cfu/ml)	Δ log cfu/ml at 6 h	Δ log cfu/ml at 24 h	Initial titres (log cfu/ml)	Δ log cfu/ml at 6 h	Δ log cfu/ml at 24 h
MPN 800	5.30±0.65	-4.06±0.93 <sup>a</sup>	-4.15±0.87 <sup>a</sup>	5.91±0.34	-4.92±0.34 <sup>a</sup>	-4.92±0.34 <sup>a</sup>
Control	5.71±0.58	+0.37±0.85	+0.44±0.72	5.83±0.38	+0.02±0.88	-0.32±0.89

MPN, meropenem

Data are expressed as means ± SD

<sup>a</sup> P=0.000 compared with control group

**Table 3** Mean  $\pm$  SD of antibiotic concentrations (mg/l) in CSF of guinea pig and rabbits for both strains: HUB 2349 and HUB SIII

Antibiotic doses (in mg/kg/day)	HUB SIII strain			HUB 2349 strain		
	3 h	6 h	24 h	3 h	6 h	24 h
MPN 800 guinea pig	0.39 $\pm$ 0.24	0.23 $\pm$ 0.16 a	<0.12 b	0.46 $\pm$ 0.12	0.28 $\pm$ 0.13	<0.12 b
MPN 600 rabbit	1.26 $\pm$ 0.34	0.32 $\pm$ 0.17	0.24 $\pm$ 0.10	1.20 $\pm$ 0.34	0.19 $\pm$ 0.14	0.15 $\pm$ 0.12

MPN, meropenem

Data are expressed as means $\pm$  SD

Meropenem was administered every 6 h [at 0, 6, 12 h (double dose)]

<sup>a</sup> Meropenem levels at 6 h were only determined in 4/8 CSF samples of guinea pig infected with HUB SIII strain. In the rest, antibiotic levels were below the level of detection (<0.12 mg/l)<sup>b</sup> All the samples were below the level of detection, which was: 0.12 mg/l

in the guinea pig model, meropenem failure could be associated to the rapid hydrolysis of DHP-I rather than an unfavourable CSF kinetics. Therefore, in accordance to previous reports, we chose a dose of 150 mg/kg in order to compensate rapid enzymatic hydrolysis. However, this dose was not higher enough to ensure a bactericidal activity in all tested animals. Furthermore, we tested antimicrobial efficacy for a longer period in comparison with other studies, so this time schedule limited the interval dosing. Nevertheless, shorter intervals would not ensure higher efficacies [15]. Meropenem has been tested at 125 mg/kg in abbreviated experiments against pneumococcal strains with different results. Friedland et al. reported poor efficacy against two resistant pneumococcal strains, although CSF peak levels were eightfold greater than the MICs [9]. On the other hand, some authors have described a bactericidal effect when administering meropenem every 4 h [8, 15]. However, in one of these studies meropenem failed, and CSF sterilization was only reached in two of eight animals after 8 h of therapy [16]. Our in vitro results confirm the dose-related bactericidal activity previously reported when meropenem concentrations above the MIC are tested [8]. According to these results and our own data, we would suggest that meropenem might be a good alternative in the therapy of

pneumococcal meningitis, but the classic rabbit model is not the best model to study meropenem activity, and another model without pharmacokinetic problems, such as the guinea pig model, might be better to study meropenem efficacy.

The rabbit model has been extensively used in order to assess antimicrobial activity in bacterial meningitis. The guinea pig model of experimental meningitis presents some limitations in comparison with the rabbit one. The small animal size does not allow serial CSF collection from the same animal, although we have used the same animal for two different time points. The use of this laboratory animal has been scarce in the study of alternative therapies for bacterial meningitis [13], so information about CSF kinetics is difficult to analyze. However, our results support the use of the guinea pig model as a good alternative in the study of meropenem efficacy.

In conclusion, meropenem has shown bactericidal activity in both experimental models of meningitis and might be considered as an alternative in the management of pneumococcal meningitis. On the other hand, this work emphasises the importance of an adequate election of the animal model for the appropriate development of studies of antimicrobial efficacy. We believe that guinea pig should be considered the best choice among laboratory animal species

**Table 4** Initial bacterial concentrations and bacterial killing rates in CSF of rabbits with pneumococcal meningitis caused by the HUB SIII strain (MIC: MPN, 0.01 $\mu$ g/ml) and the HUB 2349 strain (MIC: MPN, 0.5  $\mu$ g/ml)

Therapy group (dose in mg/kg/day)	HUB SIII strain				HUB 2349 strain			
	Initial titres (log cfu/ml)	$\Delta$ log cfu/ml at 2 h	$\Delta$ log cfu/ml at 6 h	$\Delta$ log cfu/ml at 24 h	Initial titres (log cfu/ml)	$\Delta$ log cfu/ml at 2 h	$\Delta$ log cfu/ml at 6 h	$\Delta$ log cfu/ml at 24 h
MPN 600	4.54 $\pm$ 0.47	-1.77 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	-3.20 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>	-4.32 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	4.60 $\pm$ 0.70	-2.39 $\pm$ 1.01 <sup>a</sup>	-1.95 $\pm$ 0.96 <sup>a</sup>	-3.36 $\pm$ 1.25 <sup>a</sup>
Control	4.74 $\pm$ 0.29	+0.03 $\pm$ 0.43	+0.19 $\pm$ 0.95	+0.59 $\pm$ 1.57	4.60 $\pm$ 0.70	+0.98 $\pm$ 0.6	+1.43 $\pm$ 0.38	+0.70 $\pm$ 1.45

MPN, meropenem

Data are expressed as means  $\pm$  SD<sup>a</sup> P<0.006 compared with control group

when assessing meropenem efficacy, even considering the exposed limitations.

**Acknowledges** This work was supported by a research grant from the “Fondo de Investigaciones Sanitarias” FIS 02/069 from “Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad”, Spain. A. Domenech and F. Taberner were supported by grants from the Universitat de Barcelona and S. Ribes was supported by the same FIS grant. All authors are members of the Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI CO3/14 and REIPI RD06/0008). All authors: No commercial support. All experiments were performed complying with current law for animal models (decret 214/1997 DOGC august 7th and RD 1201/2005 october 10).

## References

- Dagan R, Velghe L, Rodda JL, Klugman KP (1994) Penetration of meropenem into the cerebrospinal fluid of patients with inflamed meninges. *J Antimicrobial Chemother* 34:175–179
- Schmutzhard E, Williams KJ, Vukmirovits G, Chemlik V, Pfausler B, Featherstone A (1995) A randomized comparison of meropenem with cefotaxime or ceftriaxone for the treatment of bacterial meningitis in adults. Meropenem Meningitis Study Group *J Antimicrobial Chemother* 36(Suppl A):85–97
- Klugman KP, Dagan R, Meropenem Study Group (1995) Randomized comparison of meropenem with cefotaxime for treatment of bacterial meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 39:1140–1146
- Odio CM, Puig JR, Feris JM, Khan WN, Rodriguez WJ, McCracken GH, Bradley JD (1999) Prospective, randomized, investigator-blinded study of the efficacy and safety of meropenem vs. cefotaxime therapy in bacterial meningitis in children Meropenem Study Group. *Pediatr Infect Dis J* 18:581–590
- Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, Kaufman BA, Roos KL, Scheld WM, Whitley RJ (2004) Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis* 39:1267–1284
- Fitoussi F, Doit C, Benali K, Boacorsi S, Gelsin P, Bingen E (1998) Comparative in vitro killing activities of meropenem, imipenem, ceftriaxone and ceftriaxone plus vancomycin at clinically achievable cerebrospinal fluid concentrations against penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from children with meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 42:942–944
- Norrby SR (2000) Neurotoxicity of carbapenem antibiotics: consequences for their use in bacterial meningitis. *J Antimicrobial Chemother* 45:5–7
- Gerber CM, Cottagnoud M, Neffel KA, Täuber MG, Cottagnoud P (1999) Meropenem alone and in combination with vancomycin in experimental meningitis caused by a penicillin-resistant pneumococcal strain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18:886–870
- Friedland IR, Paris M, Ehrett S, Hickey S, Olsen K, McCracken JR (1993) Evaluation of antimicrobial regimens for treatment of experimental penicillin and cephalosporin resistant pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 37:1630–1636
- Fukasawa M, Sumita Y, Harabe ET, Tanio T, Nouda H, Kohzuki et al (1992) Stability of meropenem and effect of 1 $\beta$ -methyl substitution on its stability in the presence of renal dehydropeptidase I. *J Antimicrobial Chemother* 36:1577–1579
- Naim K, Shepherd GL, Edwards JR (1995) Efficacy of meropenem in experimental meningitis. *J Antimicrobial Chemother* 36 (Suppl A):73–84
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically-(2000) 5th edn: Approved Standard M7-A5 NCCLS, Wayne, PA
- Maiques JM, Domenech A, Cabellos C, Fernández A, Ribes S, Tubau F et al (2007) Evaluation of antimicrobial regimens in a guinea-pig model of meningitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Infect* 9:435–441
- Dacey RG, Sande MA (1974) Effect of probenecid on cerebrospinal fluid concentrations of penicillin and cephalosporin derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* 6:437–41
- Chapin-Robertson K, Edberg SC (1991) Measurements of antibiotics in human body fluids: techniques and significance. In: Lorian V (ed) *Antibiotics in laboratory medicine*. Williams and Wilkins, New York, pp 295–366
- Cottagnoud P, Cottagnoud M, Acosta F, Flatz L, Kühn, Stucki A, Entenza J (2003) Meropenem prevents levofloxacin induced resistance in penicillin resistant pneumococci and acts synergistically with levofloxacin in experimental meningitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22:656–662