

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Facultat de Medicina

Departament de Ciències Clíiques



**ESTUDI EXPERIMENTAL DEL TRACTAMENT DE LA
MENINGITIS PNEUMOCÒCICA PRODUÏDA PER
SOQUES RESISTENTS A CEFALOSPORINES DE
TERCERA GENERACIÓ.
VIRULÈNCIA, EFICÀCIA I RESPOSTA INFLAMATÒRIA**

**Memòria presentada per
SANDRA RIBES I MIRAVET
per a optar al grau de Doctora**

Barcelona, Abril de 2006

L'autora de la tesi ha comptat amb el suport de les beques procedents del

Fondo de Investigaciones Sanitarias:

Beca FIS 97/0507 (any 1999)

Beca FIS 02/0069 (any 2003-2006)

i de la Fundació August Pi i Sunyer

durant els anys 2000-2002 com a suport al projecte :

Beca FIS 00/0156

Els estudis han estat finançats pel:

Fondo de Investigaciones Sanitarias

Ministerio de Sanidad

Beca FIS 01/1235

PRODUCCIÓ CIENTÍFICA

Els resultats que s'exposen en aquesta tesi doctoral han estat presentats en congressos i posteriorment s'han publicat en revistes científiques.

Comunicacions en congressos:

1. **Ribes S**, Domenech A, Cabellos C, Tubau F, Liñares J, Viladrich PF, Gudiol F. "Meningitis neumocócica experimental producida por dos cepas con distinta sensibilidad a β -lactámicos". X Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Sevilla, Març 2002.
2. **Ribes S**, Domenech A, Taberner F, Cabellos C, Tubau F, Liñares J, Viladrich PF, Gudiol F. "Evaluation of fosfomicin in the treatment of experimental meningitis caused by a high-level of cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae*". 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Praga, República Txeca, Maig 2004.
3. **Ribes S**, Taberner F, Domenech A, Cabellos C, Tubau F, Liñares J, Viladrich PF, Gudiol F. "Evaluation of ceftriaxone (C), vancomycin (V) and rifampicin (R) alone and combined in experimental meningitis caused by highly cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae*". 44th Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Washington DC, Octubre-Novembre 2004.
4. **Ribes S**, Tubau F, Domenech A, Taberner F, Cabellos C, Liñares J, Gudiol F. "In Vitro activity of fosfomicin (F) alone and combined with amoxicillin (A), ceftriaxone (C), rifampicin (R) and vancomycin (V) against two cephalosporin resistant (CepR) strains of *Streptococcus pneumoniae*". 44th Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Washington DC, Octubre-Novembre 2004.
5. **Ribes S**, Taberner F, Domenech A, Cabellos C, Tubau F, Liñares J, Viladrich PF, Gudiol F. "Experimental study of fosfomicin combined with ceftriaxone, teicoplanin or vancomycin in the treatment of cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis". 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Copenhage, Dinamarca, Abril 2005.

Publicacions en revistes indexades:

1. **Ribes S**, Domenech A, Cabellos C, Tubau F, Liñares J, Viladrich PF, Gudiol F. 2003. Meningitis experimental producida por una cepa de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 23F con elevada resistencia a cefalosporinas. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica** 21(7): 329-33.
2. **Ribes S**, Taberner F, Domenech A, Cabellos C, Tubau F, Liñares J, Viladrich PF, Gudiol F. 2005. Evaluation of ceftriaxone, vancomycin and rifampicin alone and combined in an experimental model of meningitis caused by highly cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* ATCC 51916. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 56(5): 979-82.
3. **Ribes S**, Taberner F, Domenech A, Cabellos C, Tubau F, Liñares J, Viladrich PF, Gudiol F. 2006. Evaluation of fosfomicin alone and in combination with ceftriaxone or vancomycin in an experimental model of meningitis caused by two strains of cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 57(5): 931-6.

índex

| | |
|---------------------------|----|
| <i>Abreviatures</i> | 13 |
|---------------------------|----|

| | |
|--------------------------------|----|
| JUSTIFICACIÓ de l'ESTUDI | 17 |
|--------------------------------|----|

I. INTRODUCCIÓ

1. *Streptococcus pneumoniae*

| | |
|--|----|
| 1.1. Característiques microbiològiques | 21 |
| 1.2. Característiques estructurals | 21 |
| 1.3. Tipificació molecular | 23 |
| 1.4. Resistència Antibiòtica | 24 |
| 1.4.1. Problemàtica i Control | 24 |
| 1.4.2. Resistència a Penicil·lina | 25 |
| 1.4.3. Resistència a Cefalosporines de Tercera Generació | 27 |
| 1.4.4. Multiresistència | 30 |
| 1.5. Patogenicitat | 31 |
| 1.5.1. Serotip i Virulència/Resistència | 32 |
| 1.5.2. Virulència i Resistència | 33 |
| 1.5.3. Virulència i LTA/TAs | 33 |

2. MENINGITIS PNEUMOCÒCICA

| | |
|---|----|
| 2.1. Epidemiologia | 34 |
| 2.2. Fisiopatologia | 36 |
| 2.3. Tractament | 39 |
| 2.3.1. Aproximació al concepte d'Eficàcia Terapèutica | 39 |
| 2.3.2. Teràpia Antimicrobiana | 43 |
| 2.3.3. Tractament Antiinflamatori | 46 |
| 2.4. Model d'Infecció Experimental | 48 |
| 2.4.1. L'Experimentació Animal com a Eina de Recerca | 48 |
| 2.4.2. Models Animals d'Infecció: Meningitis Experimental | 49 |
| 2.4.3. Model de Meningitis Pneumocòcica en Conill | 50 |

3. ANTIMICROBIANS

| | |
|---|----|
| 3.1. Ceftriaxona | 51 |
| 3.1.1. Farmacocinètica i Farmacodinàmia en sèrum i LCR | 51 |
| 3.1.2. Indicació en el tractament de meningitis pneumocòcica | 52 |
| 3.2. Fosfomicina | 53 |
| 3.2.1. Farmacocinètica i Farmacodinàmia en sèrum i LCR | 53 |
| 3.2.2. Indicació en el tractament de meningitis pneumocòcica | 54 |
| 3.3. Rifampicina | 55 |
| 3.3.1. Farmacocinètica i Farmacodinàmia en sèrum i LCR | 55 |
| 3.3.2. Indicació en el tractament de meningitis pneumocòcica | 56 |
| 3.4. Teicoplanina | 57 |
| 3.4.1. Farmacocinètica i Farmacodinàmia en sèrum i LCR | 57 |
| 3.4.2. Indicació en el tractament de meningitis pneumocòcica | 57 |
| 3.5. Vancomicina | 58 |
| 3.5.1. Farmacocinètica i Farmacodinàmia en sèrum i LCR | 58 |
| 3.5.2. Indicació en el tractament de meningitis pneumocòcica | 59 |
| 3.6. Combinacions Antibiòtiques en la Meningitis Pneumocòcica | 60 |

II. HIPÒTESIS DE TREBALL I OBJECTIUS

| | |
|----------------------------|----|
| HIPÒTESIS DE TREBALL | 65 |
| OBJECTIUS | 66 |

III. DISSENY de L'ESTUDI

1. CARACTERITZACIÓ DE LES SOQUES

| | |
|-------------------------------------|----|
| 1.1. Història clínica | 69 |
| 1.2. Sensibilitat antibiòtica | 70 |
| 1.3. Tipificació molecular | 70 |

2. ESTUDIS *in vitro*

| | |
|--------------------------------|----|
| 2.1. Corbes de letalitat | 72 |
|--------------------------------|----|

| | |
|--|-----|
| 2.2. Adquisició de Resistència Antibiòtica | 72 |
| 3. MODEL ANIMAL DE MENINGITIS PNEUMOCÒCICA | |
| 3.1. Animals | 73 |
| 3.2. Anestèsics i analgèsics | 73 |
| 3.3. Model experimental | 73 |
| 3.4. Processament de mostres d'estudis de farmacocinètica | 78 |
| 3.4.1. Determinació de nivells de teicoplanina i vancomicina | 78 |
| 3.4.2. Determinació de nivells de ceftriaxona, fosfomicina i rifampicina ... | 78 |
| 3.4.3. Càlcul dels paràmetres farmacodinàmics | 79 |
| 3.5. Processament de mostres d'estudis control i d'eficàcia | 80 |
| 3.5.1. Bacterièmia secundària | 80 |
| 3.5.2. Recomptes bacterians | 80 |
| 3.5.3. Leucòcits | 80 |
| 3.5.4. Lactat | 81 |
| 3.5.5. Proteïnes | 81 |
| 3.5.6. Edema cerebral | 81 |
| 3.5.7. Nivells d'antibiòtic en LCR | 81 |
| 3.6. Anàlisi Estadística | 82 |
| IV. RESULTATS (per objectius i treballs publicats) | |
| ★ OBJECTIU 1 | 85 |
| ★ OBJECTIU 2 | 95 |
| ★ OBJECTIU 3 | 99 |
| ★ OBJECTIU 4 | 111 |
| V. DISCUSSIÓ | 129 |
| VI. CONCLUSIONS FINALS | 143 |
| VII. BIBLIOGRAFIA | 147 |
| VIII.ANNEX | 165 |

ABREVIATURES

| | |
|--------------------|---|
| aroE: | shikimate deshidrogenasa |
| ATCC: | American type culture collection |
| AUC: | àrea sota la corba, (<i>area under the curve</i>) |
| BHE: | barrera hematoencefàlica |
| C3G: | cefalosporines de tercera generació |
| CAMHB-5%SB: | brou Mueller-Hinton amb ajust de cations i suplementat amb un 5% de sang de be. |
| CDC: | Centers for Disease Control and Prevention |
| CLSI: | Clinical and Laboratory Standards Institute |
| CMI: | concentració mínima inhibidora |
| CMB: | concentració mínima bactericida |
| ddl: | D-alanina-D-alanina lligasa |
| DO: | densitat òptica |
| EARSS: | European Antimicrobial Resistance Surveillance System |
| FDA: | Food and Drug Administration |
| G6P: | glucosa-6-fosfat |
| gdh: | glucosa-6-fosfat deshidrogenasa |
| gki: | glucosa quinasa |
| IL: | interleucina |
| iv: | intravenós(a) |
| LCR: | líquid cefaloraquidi |
| LTA: | àcid lipoteicoic |
| McF: | MacFarland |
| MLST: | tipatge per seqüenciació multilocular (<i>multilocus sequence typing</i>) |
| PAF: | factor activador plaquetari |
| PBP: | proteïnes fixadores de la penicil·lina (<i>penicillin-binding proteins</i>). |
| PD: | farmacodinàmic(a) |
| PIC: | pressió intracranial |
| PFGE: | electroforesi de camp polsat (<i>pulsed-field gel electrophoresis</i>). |

| | |
|---------------------------------|--|
| PGE₂: | prostaglandina E ₂ |
| PK: | farmacocinètic(a) |
| PRP: | pneumococ resistent a penicil·lina |
| recP: | transketolasa |
| SF: | sèrum fisiològic |
| spi: | peptidasa de senyal I |
| T_{1/2}: | vida mitjana |
| TA: | àcid teicoic |
| TNF-α: | factor de necrosi tumoral alfa |
| TSB: | brou tripticasa-soja |
| TSA-5%SB: | agar tripticasa-soja suplementat amb un 5% de sang de be |
| ufc/ml: | unitats formadores de colònies per mil·lilitre |
| xpt: | xantin fosforibosiltransferasa |

Justificació de l'estudi

Des del seu primer aïllament i identificació en mostres de saliva de pacients amb pneumònia al 1881 (Pasteur a França i Sternberg als Estats Units), *Streptococcus pneumoniae* ha estat protagonista dins de la història de la Microbiologia. En tot aquest temps, la investigació amb aquest microorganisme ha contribuït al coneixement de la genètica molecular, la resistència antibiòtica i la immunoprofilaxis amb vacunes.

Però no tot són bones notícies. El pneumococ, responsable d'infeccions locals i invasives, constitueix un problema seriós a la salut pública. És la principal causa d'otitis mitjana aguda en nens i de pneumònia adquirida en la comunitat en adults, a més a més d'estar associat a bacterièmia i meningitis en pacients de qualsevol edat.

En el cas de la meningitis pneumocòcica, tot i els avenços terapèutics que han aconseguit millorar-ne el pronòstic, la mortalitat total és força elevada (d'un 20-30%) i no ha disminuït de forma significativa en els darrers anys. A més a més, un percentatge considerable dels pacients que sobreviuen, adults i nens, presenten seqüeles neurològiques moltes vegades irreversibles¹⁻³. I és que la meningitis és una malaltia complicada des del punt de vista farmacològic per diverses raons:

- perquè s'entén com una infecció localitzada però de difícil accés. El SNC és un compartiment amb unes característiques úniques. La presència de barreres amb una clara finalitat protectora limita el pas de substàncies associades a la pròpia resposta immune així com la penetració dels antibiòtics.
- per la existència de soques de *S. pneumoniae* multiresistents que no garanteixen la eficàcia del tractament empíric. La resistència antibiòtica és un fenomen natural però es veu afavorit per un consum excessiu d'antimicrobians.
- per la resposta inflamatòria que es genera a nivell de LCR resultat de l'acció dels components bacterians i dels mateixos antibiòtics, i que és responsable del dany cerebral associat a aquesta malaltia.

L'elecció d'un tractament adequat és doncs, un aspecte decisiu. El paradigma d'antimicrobià ideal és una molècula de petit tamany, de mínima unió a proteïnes plasmàtiques, amb activitat d'ampli espectre, de baixa toxicitat i amb un mecanisme d'acció que impedeixi el desenvolupament de qualsevol tipus de resistència. D'altra banda, l'antimicrobià ideal hauria de presentar una difusió en el LCR que no es veiés afectada per l'administració adjuvant de les substàncies antiinflamatòries que s'administren en la meningitis per a atenuar la resposta inflamatòria.

Històricament s'ha utilitzat la penicil·lina com a tractament empíric de la meningitis pneumocòcica i el cloramfenicol com a alternativa en pacients al·lèrgics, però l'elevada prevalença de soques resistents han contraindicat l'ús d'ambdós antibiòtics. En aquest context, cefotaxima i ceftriaxona van prendre el relleu i actualment constitueixen el tractament empíric de la meningitis pneumocòcica produïda per soques, amb una CMI a penicil·lina i C3G de fins a 2 µg/ml en el cas de cefotaxima que pot ser administrada a dosis elevades, i de fins a 1 µg/ml per a ceftriaxona degut a la limitació en la dosi⁴. La documentació de fracassos terapèutics en soques amb una CMI > 1 µg/ml fa recomanable l'addició de vancomicina com a combinació empírica en àrees amb una elevada prevalença de soques PRP⁵⁻⁷.

Espanya va ser un dels primers països que va presentar una elevada prevalença de *S. pneumoniae* multiresistents⁸. En la dècada dels 90, al voltant d'un 40% dels aïllaments de pneumococ en LCR eren resistents a penicil·lina, mentre que la resistència a C3G oscil·lava entre un 3-20%⁹. La realitat d'unes opcions terapèutiques cada vegada més limitades va propiciar l'estudi experimental d'alguns antibiòtics no β-lactàmics amb activitat antipneumocòcica com rifampicina, vancomicina o noves quinolones aconseguint resultats variables. Actualment, la disminució en la prevalença de soques amb una CMI ≥ 2 µg/ml a C3G fa difícil elaborar estudis clínics que valorin l'eficàcia d'aquestes o d'altres opcions terapèutiques com són la combinació de C3G més rifampicina o vancomicina més rifampicina. La manca de coneixement s'accentua en el cas de soques amb un elevat grau de resistència a C3G (> 4 µg/ml), descrites a Estats Units i recentment a Espanya¹⁰⁻¹³. Aquestes soques són poc freqüents a la clínica i avui per avui existeixen dubtes sobre el seu comportament *in vivo* i sobre quina seria la millor estratègia terapèutica a seguir en cas de produir-se una disseminació del nivell de resistència antibiòtica que les caracteritza.

En aquest marc es fa necessari l'estudi del paper de les combinacions estàndard així com el d'altres antimicrobians actius amb una elevada penetració a través de la BHE, com la fosfomicina, que puguin constituir alternatives segures davant de soques de pneumococ resistent sigui quin sigui el patró de sensibilitat a β-lactàmics. El model experimental de meningitis és la millor eina per a valorar l'eficàcia i la modulació de l'activitat inflamatòria de possibles opcions terapèutiques.

I. Introducció

1. *Streptococcus pneumoniae*

1.1. CARACTERÍSTIQUES MICROBIOLÒGIQUES¹⁴

Streptococcus pneumoniae o pneumococ és un coc gram positiu de 0,5-2 µm de diàmetre, de forma ovalada que es disposa en parelles o formant cadenes curtes. Les característiques fenotípiques en les què es basa la seva identificació en el laboratori són l'absència de l'enzim catalasa, la sensibilitat a optoquina i la lisi en presència de sals biliars.

És un microorganisme anaerobi facultatiu, immòbil que no forma espores. Pel seu creixement i multiplicació té requeriments nutricionals específics com un aportament proteic i suplementos hematològics. Creix bé en medis enriquits amb un 5-10% de sang de be, en una atmosfera amb un 5-10% de CO₂ i a una temperatura de 37°C.

En agar sang les colònies joves són rodones, llises, brillants i en condicions aeròbiques, estan envoltades per un halo de α-hemòlisi. Els cultius antics produeixen enzims autolítics que primer transformen els bacteris en gram negatius i posteriorment provoquen la seva lisi.

1.2. CARACTERÍSTIQUES ESTRUCTURALS^{14,15}

La superfície de *S. pneumoniae* consta de càpsula, paret cel·lular i membrana plasmàtica.

La Càpsula polisacàrida representa el major factor de virulència del pneumococ per la seva acció antifagocitària en l'hoste immune. El grau de virulència no està associat al gruix capsular sinó a la seva composició química¹⁶. Les soques mutants no encapsulades (soques rugoses o *R* de *rough*) rarament produeixen infecció en humans i animals d'experimentació¹⁷, ja que són fagocitades amb més facilitat que les soques capsulades de tipus salvatge (soques brillants o *S* de *smooth*).

La càpsula actua també com antigen estimulant la formació d'anticossos específics que protegirien l'hoste de la reinfecció per soques amb el mateix polisacàrid capsular. La seva composició antigènica és variable el què permet distingir fins a 90 serotips i 46 serogrupos capsulars. De les tècniques disponibles, el mètode clàssic per a identificar el serotip/serogrup és la reacció antigen capsular-anticòs que provoca l'aglutinació, precipitació i inflamació de la càpsula i que es coneix com a fenomen de Quellung. La classificació danesa, que empra els antisèrums procedents del *Statens Serum Institut* de Copenhaguen, és la que s'utilitza més habitualment.

La Paret Cel·lular està formada per potents factors proinflamatoris que activen la via alternativa del complement: el *peptidoglicà* n'és el component majoritari, té acció antigènica i és la diana dels antibiòtics que actuen sobre la paret cel·lular; el *polisacàrid C*, format per àcids teicoïcs (TA) units al peptidoglicà per la seva cara externa; i l'*àcid lipoteicoïc* (LTA) unit a la membrana plasmàtica.

LTA i TA són rics en fosforilcolina, molècula essencial pel creixement del pneumococ que s'adhereix als receptors associats a colina presents en totes les cèl·lules humanes. LTA/TA són els components amb major capacitat proinflamatòria de la paret cel·lular, indiscutibles mediadors del procés inflamatori en LCR tal i com s'ha demostrat en la meningitis experimental^{18,19}.

La Membrana Plasmàtica és una estructura lipoproteica que engloba *factors de virulència* (taula 1)²⁰ i altres proteïnes com són les *proteïnes fixadores de penicil·lina* que participen en la síntesi i organització del peptidoglicà durant la divisió cel·lular i que tenen un paper fonamental en l'adquisició de resistència als β -lactàmics.

També s'hi localitzen les *autolisines* amb activitat enzimàtica dependent de fosforilcolina. La seva funció natural és la degradació de la paret durant la divisió cel·lular. No obstant, en determinades condicions (durant la fase estacionària de creixement o en presència d'antibiòtics), degraden el peptidoglicà produint disrupció i lisi cel·lular el què afavoreix l'alliberament de neuraminidasa, pneumolisina i els components de la paret cel·lular.

| <i>Factor de virulència</i> | <i>Efecte biològic sobre l'hoste</i> |
|---|---|
| Proteïna superficial A | Estabilització càpsula i Inhibició via alternativa del complement |
| Adhesines Proteasa de la IgA1 Neuraminidasa | Colonització de la Nasofaringe & Migració |
| Hial·luronidasa Pneumolisina* | Invasió Tissular & Disseminació Hematògena |

Taula 1. Factors de virulència ubicats en la membrana plasmàtica de *S. pneumoniae*.

* és també un factor proinflamatori perquè indueix la síntesi de TNF- α i IL-1, i activa la via alternativa del complement.

1.3. TIPIFICACIÓ MOLECULAR

La caracterització molecular de *S. pneumoniae* és una eina indiscutible pel coneixement de la seva biologia poblacional.

Una de les primeres aplicacions dels mètodes moleculars va ser l'establiment de línies clonals. La tècnica d'electroforesi en gel de camp polsat (PFGE) comprèn una digestió enzimàtica i la posterior separació en un gel d'agarosa de fragments d'ADN de gran tamany (10-800 kb). És una metodologia altament discriminatòria ja que detecta petites variacions del genoma bacterià. No obstant, aquest aparent avantatge pot resultar un inconvenient ja que amb tanta variabilitat es pot perdre la capacitat d'analitzar l'origen comú dels llinatges.

Per a refinar la tècnica anterior i per moltes altres aplicacions com són la identificació de soques virulentes i/o de soques amb resistència antibiòtica es va desenvolupar la tècnica de MLST^{21,22}. El MLST consisteix en l'amplificació, seqüenciació i comparació de set fragments interns d'ADN d'un tamany d'entre 450-500 pb de set gens altament conservats (*housekeeping genes*) del genoma bacterià: *aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt* i *ddl*. En cada gen, s'assigna un al·lel a cada seqüència diferent fins a obtenir sèries de set al·lells. Les combinacions al·lèliques (p.e. 1-8-6-2-6-4-6) defineixen una seqüència tipus ó ST (*sequence type*) que s'identifica amb un número (ST 1, ... ST 37, ...). Els diferents perfils al·lèlics (disponibles a <http://spneumoniae.mlst.net/>) permeten dibuixar un dendograma on s'observa que la majoria de soques que presenten STs idèntics o molt similars (agrupades dins d'un mateix clon) formen part del mateix serotip. El manteniment d'aquesta identitat genètica s'atribuiria a una baixa prevalença en portadors sans que disminuiria les oportunitats d'intercanvi de material genètic, o bé a la producció de més material capsular que dificultaria aquest intercanvi.

Els pocs exemples d'aïllaments amb el mateix ST però amb diferent serotip són conseqüència de recombinacions dels gens codificants pel polisacàrid capsular^{21,23}. Tot i que el canvi de serotip és un fenomen poc freqüent, s'ha produït en pneumococs resistents associats a colonització i infecció en nens²³.

A partir d'aquí ens hauríem de plantejar si recombinacions genètiques que impliquen l'adquisició de resistència antibiòtica i que podrien o no provocar un canvi de serotip, permetrien seleccionar soques amb un potencial invasiu major i millor adaptades, tot un repte a l'hora de desenvolupar sistemes de reconeixement i vigilància d'aquests clons.

1.4. RESISTÈNCIA ANTIBIÒTICA

1.4.1. Problemàtica i Control

La resistència antibiòtica és una característica intrínseca natural d'alguns bacteris que s'expressa en gens cromosòmics. No obstant, una utilització incorrecta i/o una exposició prolongada a agents antimicrobians poden facilitar-ne l'adquisició, ja sigui per la transferència d'ADN codificant per gens de resistència d'espècies resistents a receptors sensibles, o bé per l'aparició de mutacions en gens que codifiquen per proteïnes bacterianes involucrades en resistència antibiòtica.

El problema es magnifica quan un patògen mostra una clara tendència a captar material genètic procedent d'altres bacteris siguin o no del mateix genotip, serotip i/o espècie, com és el cas de *S. pneumoniae*. Com a inconvenient addicional, la globalització i l'eliminació de barreres que faciliten la propagació del pneumococ a nivell geogràfic. La gran *promiscuïtat* i *l'afició a viatjar* que mostra el pneumococ propicia l'adquisició i disseminació de resistència a múltiples antibiòtics, fet que complica de manera dramàtica el tractament de les infeccions greus de les què n'és agent etiològic.

Com a mecanisme principal per al control dels nivells de resistència antibiòtica disposem de diversos programes epidemiològics que es dediquen a monitoritzar la sensibilitat d'algunes espècies bacterianes a diversos antimicrobians: l'*Alexander Project* (<http://www.alexander-network.com>) que estudia els patògens del tracte respiratori inferior arreu del món; la Xarxa Europea de Vigilància de Resistència a Antimicrobians en Patògens Invasius (EARSS, <http://www.earss.rivm.nl/>) o als Estats Units, dins del CDC, el Centre Actiu d'Epidemiologia Bacteriana (<http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/abcs/default.htm>) que s'ocupa de la vigilància de patògens respiratoris. D'altra banda, es recomana la implantació i seguiment d'una política restrictiva en el consum d'antibiòtics per a minvar la freqüència de resistències.

Atesa l'elevada prevalença de resistència antibiòtica, en tots els aïllaments de *S. pneumoniae* procedents de mostres clíniques és obligatori realitzar de forma rutinària els estudis de sensibilitat antibiòtica a: penicil·lina, cefotaxima/ceftriaxona, eritromicina i ciprofloxacino. El CLSI publica periòdicament les directrius metodològiques a seguir per a realitzar aquests estudis. Els darrers protocols editats són el M100-S15 i M100-S16 corresponents als anys 2005 i 2006, respectivament.

1.4.2. Resistència a Penicil·lina

Determinació de la Sensibilitat i Punts de tall (*Breakpoints*)

Per a l'estudi de la sensibilitat de *S. pneumoniae* a penicil·lina es recomana utilitzar la tècnica de difusió en agar d'un disc d'1 µg d'oxacil·lina, en la que un halo inferior a 19 mm és indicador de resistència. Per a especificar el nivell de resistència cal determinar la CMI mitjançant un mètode quantitatiu com és la microdilució o una alternativa senzilla i ràpida com és el mètode de difusió en agar amb tires de E-test (de *Epsilon-Test*). La correlació entre els valors obtinguts amb ambdues tècniques és bona, tot i que habitualment la CMI obtinguda amb el E-test sol estar una o dues dilucions per sota del valor obtingut amb la microdilució.

El valor de la CMI en pneumococ sensible a penicil·lina és de $\leq 0,06$ µg/ml. Els punts de tall per a detectar els diferents nivells de resistència són 0,12-1 µg/ml que indica un grau intermedi, i ≥ 2 µg/ml que defineix resistència.

Mecanisme de Resistència

En *S. pneumoniae* s'han descrit fins a sis PBPs: 1a, 1b, 2a, 2b, 2x i 3a. El mecanisme de resistència a penicil·lina és degut únicament a alteracions en l'estructura i tamany d'algunes d'aquestes PBPs que redueixen la seva afinitat com a diana de l'antibiòtic però mantenen la seva funció fisiològica^{24,25}.

Els gens que codifiquen per PBPs alterades tenen estructura de mosaic ja que són fragments d'ADN mixt resultants de successius processos de transformació en els que es dona un intercanvi genètic entre els gens *pbp* originals de *S. pneumoniae* i regions procedents d'altres pneumococs o d'altres espècies d'estreptococs (com són *S. mitis*, *S. oralis* i *S. sanguis*)²⁶⁻²⁸.

Per a adquirir diferents graus de resistència a penicil·lina són necessaris canvis en algunes PBPs. Alteracions en la PBP 1a i PBP 2x confereixen un resistència intermèdia. L'adquisició d'un grau elevat requereix addicionalment gens mosaics *pbp 2a i 2b*^{26,29,30}.

Epidemiologia

Des dels primers casos de pneumococ amb sensibilitat reduïda a penicil·lina descrits l'any 1967^{31,32} i la primera epidèmia a Sud-àfrica per soques multiresistents a finals dels anys setanta³³, la resistència a penicil·lina s'ha estès arreu del món³⁴.

En la disseminació de la resistència és important la transferència horitzontal dels gens mosaic *pbp* i la propagació geogràfica demostrada per les soques que en són portadores. El cas més excepcional és el del clon Spain^{23F}-1, resistent a penicil·lina, cloramfenicol, cotrimoxazol i tetraciclina, descrit per primera vegada a Espanya als anys 80 i que a partir de 1991 es va aïllar als Estats Units, Sud-àfrica, Mèxic i altres països europeus^{35,36}.

En la prevalença de la resistència a penicil·lina hi convergeixen diversos factors com són: el serotip, el tipus de mostra (més freqüent en mostres respiratòries que en mostres invasives), l'edat del pacient (més freqüent en nens i adults > 65 anys), un consum recent de β -lactàmics o l'àrea geogràfica (per proximitat a països amb xifres elevades)³⁷.

Evolució de la Resistència a Espanya. Comparació amb altres països

Espanya és un dels països capdavanters en xifres de resistència i consum d'antibiòtics³⁸⁻⁴⁰ (figura 1). La prevalença de PRP va augmentar des d'un 6% al 1979 fins a un màxim d'un 44% als anys 80⁸. Des de la dècada dels 90 fins a l'actualitat ha disminuït fins a un interval gens menyspreable del 35-40%^{39,40}, tendència que pot atribuir-se a un consum antibiòtic molt més racional així com la introducció de noves formulacions de β -lactàmics i noves quinolones amb una activitat antipneumocòcica millorada³⁷.

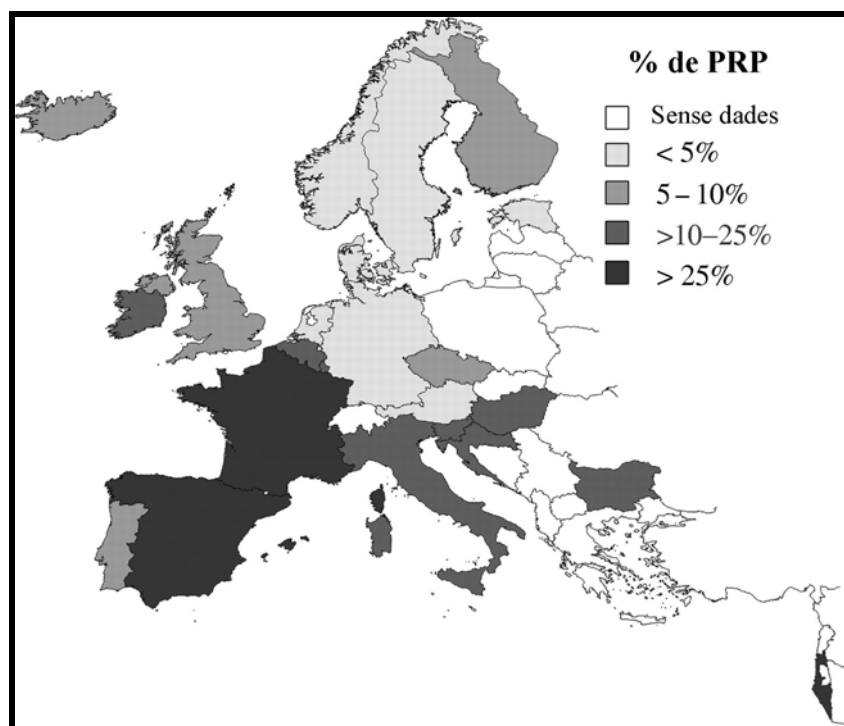


Figura 1. Distribució de pneumococ resistent a penicil·lina (PRP) en aïllaments invasius durant els anys 1999 i 2002, segons la base de dades del EARSS⁴⁰.

1.4.3. Resistència a Cefalosporines de Tercera Generació

Determinació de la Sensibilitat i Punts de tall (*Breakpoints*)

Els mètodes de difusió no han obtingut bons resultats a l'hora d'establir la sensibilitat del pneumococ a C3G. Per aquesta raó el CLSI recomana determinar la CMI mitjançant microdilució o utilitzar l'E-test com a primera aproximació més ràpida.

Des de l'any 2002, els criteris que dicta el CLSI per a detectar la resistència a C3G en aïllaments de *S. pneumoniae* difereixen en funció del tipus de mostra. En els cas de malalties no meningies en les què les C3G són altament eficaces, els aïllaments de pneumococ amb una CMI ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$ són considerats sensibles i els que tenen una CMI ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ es classifiquen com a resistents. Per aïllaments procedents de LCR, els criteris són més exigents i es basen en els fracassos terapèutics associats a pneumococs amb una CMI ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ a C3G (taula 2).

| CMI (mostra de LCR) | CEFOTAXIMA/CEFTRIAXONA | Interpretació |
|-----------------------------|------------------------|-------------------------------|
| ≤ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ | | Sensible |
| 1 $\mu\text{g/ml}$ | | Resistència Intermèdia |
| ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ | | Resistent |

Taula 2. Punts de tall per a determinar la sensibilitat a C3G d'aïllaments de *S. pneumoniae* en mostres de LCR.

Mecanisme de Resistència

La resistència a C3G està determinada per la presència d'alteracions en PBP 1a i PBP 2x^{41,42} que disminueixen la seva afinitat per unir-se a l'antibiòtic. Tanmateix, una única substitució (Thr-550→Ala) en el gen *pbp 2x* és la responsable d'un elevat grau de resistència (amb un augment de la CMI de fins a 16-32 $\mu\text{g/ml}$)⁴². A part d'aquestes modificacions, recentment s'ha demostrat en soques mutants de laboratori que la presència d'un gen mosaic *pbp 2a* també disminueix la sensibilitat a C3G²⁸. Canvis en la PBP 2b no contribuirien a l'adquisició de resistència a C3G, ja que les cefalosporines no es fixen a aquesta proteïna.

En general, els pneumococs que són resistents a penicil·lina i C3G presenten una CMI a la penicil·lina superior a la CMI a C3G. No obstant, s'han descrit pneumococs amb aquesta relació de CMIs invertida. En algun d'aquests casos s'ha observat que una mutació única en el gen de la *pbp 2x* que resulta en un elevat nivell de resistència a C3G causa alhora una pèrdua de resistència a penicil·lina⁴².

Epidemiologia

Les primeres notícies sobre soques de *S. pneumoniae* amb sensibilitat reduïda a C3G es remunten al 1989, quan la prevalença en aïllaments invasius es quantificava en un 20%⁴³. Des d'aleshores s'han documentat fracassos terapèutics en casos de malaltia pneumocòcica greu tractats amb una C3G en monoteràpia i causats per pneumococs amb una CMI ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ ^{5-7,10-13}.

La principal preocupació en referència al desenvolupament de resistència a C3G va sorgir quan es va descobrir que els gens *pbp 1a* i *pbp 2x* estan localitzats físicament molt propers en una regió cromosòmica, pel què la transformació d'una soca sensible en una soca resistent es pot realitzar en un únic pas en el laboratori. Així doncs, alguns autors temien que aquest mateix pas es donés fàcilment en la naturalesa i que la disseminació de la resistència a C3G arreu del món fos una qüestió de temps.

Actualment podem dir que les pitjors prediccions no s'han complert perquè la prevalença de soques resistents no ha anat en augment. No obstant, segueixen apareixent casos esporàdics de difícil tractament com els relacionats amb soques amb una CMI ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ ^{7,10-13}.

Evolució de la Resistència a Espanya. Comparació amb altres països

Un estudi epidemiològic amb soques invasives aïllades en l'Hospital de Bellvitge va mostrar que els pneumococs amb una CMI = 2 $\mu\text{g/ml}$ passaven de no existir al 1989 a suposar un 15% dels aïllaments l'any 1996⁴⁴. En els darrers anys, la prevalença de soques resistents a C3G segueix un patró descendent tant a Espanya (figura 2) com en altres països (figura 3).

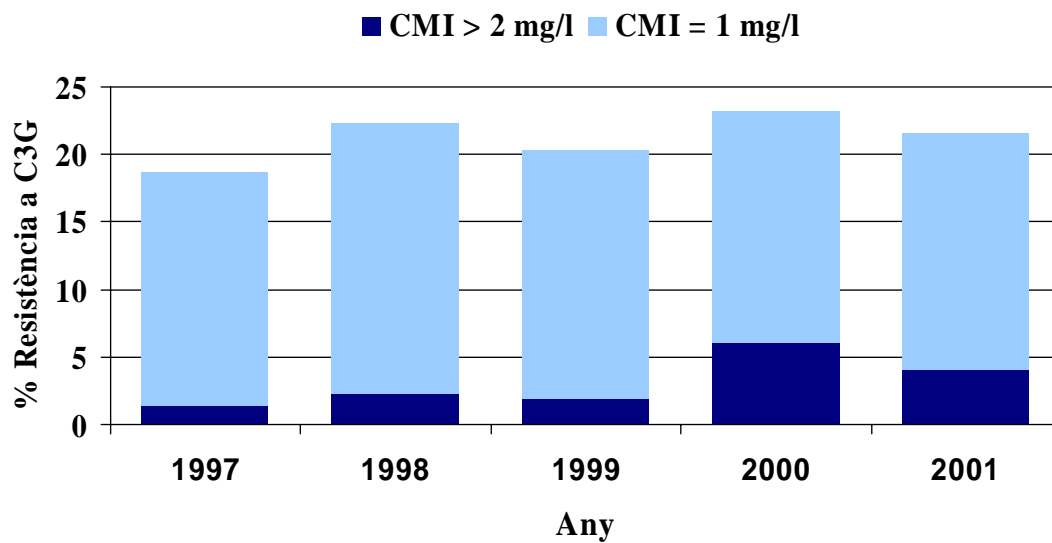


Figura 2. Evolució de la resistència a cefotaxima a Espanya entre els anys 1997 i 2001 segons el *Centro Nacional de Microbiología de Majadahonda*³⁸.

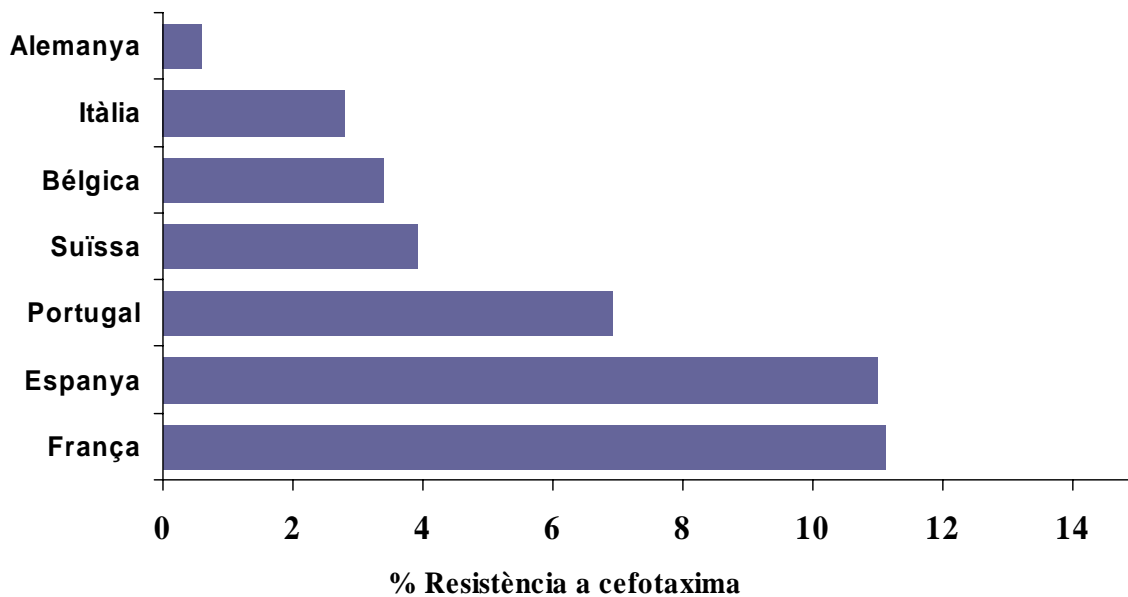


Figura 3. Prevalença de la resistència a cefotaxima en pneumococ (CMI \geq 1 μ g/ml) entre els anys 2001 i 2003 segons el *PneumoWorld Study Group*⁴⁵.

1.4.4. Multiresistència.

La major part de soques de pneumococ resistents a penicil·lina i a C3G presenten resistència creuada amb la resta de β -lactàmics i amb altres antibiòtics, fet que complica el tractament d'infeccions pneumocòciques (taula 3).

| Antibiòtic | Breakpoints* (valors CMI) | Xifres de Resistència | Comentaris | Referència |
|----------------------|------------------------------|-----------------------|--|------------|
| <i>Amoxicil·lina</i> | > 4 µg/ml | 8-9% | Aparició de soques amb una CMI a amoxicil·lina superior a la CMI a penicil·lina. | 37,45 |
| <i>Clindamicina</i> | > 0,25 µg/ml | 21-40% | | 39,45 |
| <i>Cloramfenicol</i> | > 4 µg/ml | 20-30% | | 45 |
| <i>Eritromicina</i> | > 0,25 µg/ml | 28- 35% | Augment progressiu des d'un 1% al 1979 fins a 30% al 1998 | 37,39 |
| <i>Ciprofloxacín</i> | > 2 µg/ml | 0,4-4,6% | Increment: d'un 0,9% (1991-1992) fins un 3% (1997-1998) | 37, 39,45 |
| <i>Levofloxacín</i> | ≥ 2 µg/ml | 0,6-1% | | 39,45 |
| <i>Rifampicina</i> | > 1 µg/ml | 0,4-1,5% | | 39,46 |
| <i>Tetraciclín</i> | > 2 µg/ml | 22-47% | Disminució gradual des dels anys 80 fins avui | 39,45 |
| <i>Vancomicina</i> | > 1 µg/ml | 0% | | 37,39 |

* criteris d'interpretació segons el CLSI

Taula 3. Xifres de resistència antibiòtica en aïllaments invasius de *S. pneumoniae* a Espanya (anys 2001-2003).

1.5. PATOGENICITAT

En condicions normals, el pneumococ aspirat és eliminat amb rapidesa de les vies respiratòries inferiors mitjançant la tos, la funció mucociliar i en última instància, la fagocitosi i la producció d'anticossos.

La colonització depèn de l'edat, és estacional amb un pic a l'hivern i es veu especialment afavorida en espais tancats com escoles bressol, presons o campaments militars. Entre un 5-10% d'adults sans i un 20-70% de nens sans són portadors asimptomàtics de *S. pneumoniae* en la seva la mucosa nasofaríngia⁴⁷.

El pas de microorganisme comensal a patògen és un procés complex, fruit de la interacció entre l'estat immunològic de l'hoste i el bacteri. La *patogenicitat* d'un microorganisme és la capacitat que presenta per a superar les barreres defensives de l'hoste, multiplicar-se i produir una malaltia, i es diferencia de la *virulència* intrínseca del patògen que fa referència al grau de dany tissular i a la mortalitat que pot provocar.

S. pneumoniae és un patògen exclusivament humà, principal responsable d'otitis mitjana aguda en nens i de pneumònia adquirida en la comunitat en adults, a més a més de ser el causant d'altres infeccions com meningitis, bacterièmia, sinusitis, i de forma més minoritària, mastoïditis, artritis, peritonitis i endocarditis.

La pèrdua d'integritat de l'epiteli respiratori per infeccions virals, tabaquisme, agents irritants o al·lèrgics, així com l'alteració dels reflexes neuromusculars que protegeixen de l'aspiració de les secrecions orofaríngies augmentaria la susceptibilitat de l'hoste a ser envaït. En la patogenicitat del pneumococ no només hi participen els seus factors de virulència, sinó també el tipus de serotip, l'adquisició de resistència antibiòtica o la concentració de factors proinflamatoris (LTA/TAs) a nivell de paret cel·lular. El canvi d'estatus (de comensal a patògen) del pneumococ en l'hoste s'activaria més probablement per l'adquisició d'un nou serotip més patògen i no pas per una condició de portador crònic de múltiples serotips⁴⁸.

Si existeix o no una relació entre virulència, serotip, resistència i els nivells de LTA/TAs presents en la paret cel·lular és una qüestió prou complexa per a trobar divergències en els escassos treballs que hi ha a la literatura.

1.5.1. Serotip i Virulència/Resistència

La majoria dels serotips pneumocòcics són no patogènics i només 16 dels 90 descrits estan associats a malaltia pneumocòcica invasiva (o MPI, entesa com l'aïllament de *S. pneumoniae* d'un lloc estèril, ja sigui sang, líquid pleural, LCR, ...). A més a més, la resistència antibiòtica s'atribueix a uns pocs serotips i/o clons específics. El serotip doncs, és un factor més a considerar a l'hora d'establir un pronòstic.

A Espanya, l'estudi i serotipatge d'aïllaments invasius procedents de tota la població elaborat pel *Laboratorio de Referencia de Neumococos del Instituto de Salud Carlos III* durant els anys 1990 i 2002 va revelar que existeixen diferències en la freqüència en què determinats serogrupos s'associen a MPI, de manera que els més freqüents van ser: 3, 6, 9, 14, 19 i 23; i d'altra banda que el 86% de les soques amb resistència pertanyien als serogrupos 6, 9, 14, 19 i 23^{9,37,38}. Més concretament, l'estudi de pneumococs procedents de LCR a Espanya entre 1997 i 1998 va mostrar que el 38% de les soques eren resistents a penicil·lina, i que bàsicament s'agrupaven dins dels clons Spain^{23F}-1, Spain^{6B}-2 i Spain^{9V}-3⁴⁹.

Dos estudis clínics han establert una relació entre alguns serotips (1, 3 i 9V) i l'índex de mortalitat en pacients amb meningitis i pneumònia pneumocòciques⁵⁰. També alguns treballs en peritonitis experimental han observat una forta correlació entre la virulència en ratolins (mesurada en dies des de la inoculació fins la mort) i el serotip capsular de la soca de pneumococ causant de la infecció⁵¹.

La variabilitat en el serotip pneumocòcic també és important en la resposta inflamatòria que es genera en la meningitis i en conseqüència, en les possibles seqüeles que se'n poden derivar. En el model animal s'ha demostrat que la inoculació intracisternal de soques amb diferent serotip produeix fins a tres perfils fisiopatològics diferents^{50,52,53} segons el grau de resposta inflamatòria que generen. Aquesta resposta inflamatòria (lleu, moderada o greu) es quantifica mesurant el nombre de leucòcits, la concentració d'àcid làctic, proteïnes, TNF- α i IL-8 en el LCR a les 24 h postinoculació. Els serotips 3, 6B, 14 i 23F van induir una resposta inflamatòria més severa que la provocada pels serotips 1, 5, 9 i 7F⁵²⁻⁵⁴.

1.5.2. Virulència i Resistència

En la clínica, els aïllaments invasius són majoritàriament sensibles a penicil·lina i els no invasius estan associats a resistència^{43,55} el que ha suggerit que per adquirir resistència caldria pagar un preu igual a la pèrdua de virulència. Aquesta hipòtesi s'ha confirmat en el model murí de peritonitis pneumocòcica on es va observar que aïllaments PRP tenien una capacitat invasiva nul·la⁵⁶. Per aprofundir en els possibles mecanismes implicats, el mateix grup va desenvolupar mutants genètics resistents a penicil·lina per a estudiar per separat el paper de la PBP 2x i de la PBP 2b en la pèrdua de virulència en el model de peritonitis⁵⁷. Es va trobar una forta correlació entre les alteracions en la PBP 2x que van proporcionar adquisició de resistència i les que van causar pèrdua de virulència. En canvi, les mutacions en la PBP 2b associades a resistència no van coincidir amb les alteracions que van disminuir la virulència.

Com a contrapunt del binomi resistència-pèrdua de virulència, el treball de Fernández *et al.* en el model experimental de meningitis va mostrar que la resposta inflamatòria induïda per soques amb diferent sensibilitat a β -lactàmics (i diferent serotip) era similar i de tipus sever⁵⁴, suggerint que la sensibilitat antibiòtica no seria directament proporcional a una major activitat inflamatòria a nivell d'espai subaracnoïdal i per tant, a un major dany cerebral. En dos estudis amb més de 100 casos de meningitis pneumocòcica en nens, no es van trobar diferències entre soques sensibles i resistents a penicil·lina pel que fa a presentació, severitat, pronòstic de la malaltia i durada de l'ingrés^{1,58}.

1.5.3. Virulència i LTA/TAs

Seguint amb la hipòtesi que sensibilitat antibiòtica no significa major virulència, alguns treballs han demostrat el paper d'alguns components de la paret cel·lular pneumocòcica en la inducció de dany cerebral. La inoculació intracisternal de fragments de paret cel·lular procedents de diferents soques pneumocòciques va influir en la presència/absència d'edema cerebral en conills⁵². El principal responsable de les diferències trobades va ser la composició química específica dels fragments, sobretot en relació als nivells de LTA/TAs.

A la pràctica clínica s'ha trobat una relació entre uns nivells elevats de LTA en LCR (> 2000 ng/ml) i la presència de seqüeles neurològiques en una sèrie de 30 pacients amb meningitis pneumocòcica⁵⁹.

2. MENINGITIS PNEUMOCÒCICA

2.1. EPIDEMIOLOGIA

La meningitis bacteriana és una malaltia que apareix en totes les edats, però és més comú en nens menors de 2 anys, en adults majors de 65 anys i en situacions en les què les defenses de l'hoste es troben debilitades⁶⁰.

Haemophilus influenzae, *Neisseria meningitidis* i *Streptococcus pneumoniae* en són responsables del 70-85% dels casos. La vacunació eficient contra *H. influenzae* de tipus B a l'Amèrica del Nord i a l'Oest d'Europa en la darrera dècada ha produït canvis en la epidemiologia de la meningitis bacteriana: esdevé una malaltia més comú en la població adulta i *N. meningitidis* i *S. pneumoniae* passen a ser els agents predominants en casos de meningitis en nens majors d'un mes⁶¹. A Espanya, *S. pneumoniae* és el segon agent causant de meningitis després de *N. meningitidis* del grup B⁶².

Incidència

Els estudis epidemiològics sobre meningitis pneumocòcica a Espanya s'han potenciat sobretot en els darrers deu anys, i la majoria s'han desenvolupat en algunes comunitats autònomes: Catalunya, Madrid, Navarra, País Basc i puntualment a Astúries, Múrcia i València⁶³⁻⁶⁵. La major part dels treballs s'han dissenyat de forma retrospectiva amb el conseqüent biaix en l'estimació de dades per pèrdua de pacients. Els pocs estudis prospectius per un mateix grup de població en una mateixa regió aporten una incidència superior i més propera a la realitat que la descrita pels estudis retrospectius.

La incidència de meningitis pneumocòcica en la població infantil a Espanya varia regionalment amb uns valors que oscil·len entre 4 i 7 casos/100000 nens entre 0 i 5 anys, i que es dupliquen si la població estudiada inclou només menors de 2 anys^{63,65,66} (figura 4). Les xifres són superiors a les d'altres països d'Europa (nº de casos cada 100000 nens menors de 2 anys: 5,64 a Suïssa⁶⁷ i 7,2 a Alemanya⁶⁸) i que als Estats Units (6,6 casos/100000 nens menors de 2 anys)⁶⁹.

Les dades sobre la incidència en la població adulta són escasses. Un treball elaborat a Catalunya entre els anys 1997 i 1999 indica una incidència de 1,7 casos/100000 persones majors de 65 anys⁶⁴. Les xifres són similars a les trobades en un estudi a Gales i Anglaterra on s'han estimat valors d'entre 0,85 i 1,2 casos⁷⁰.

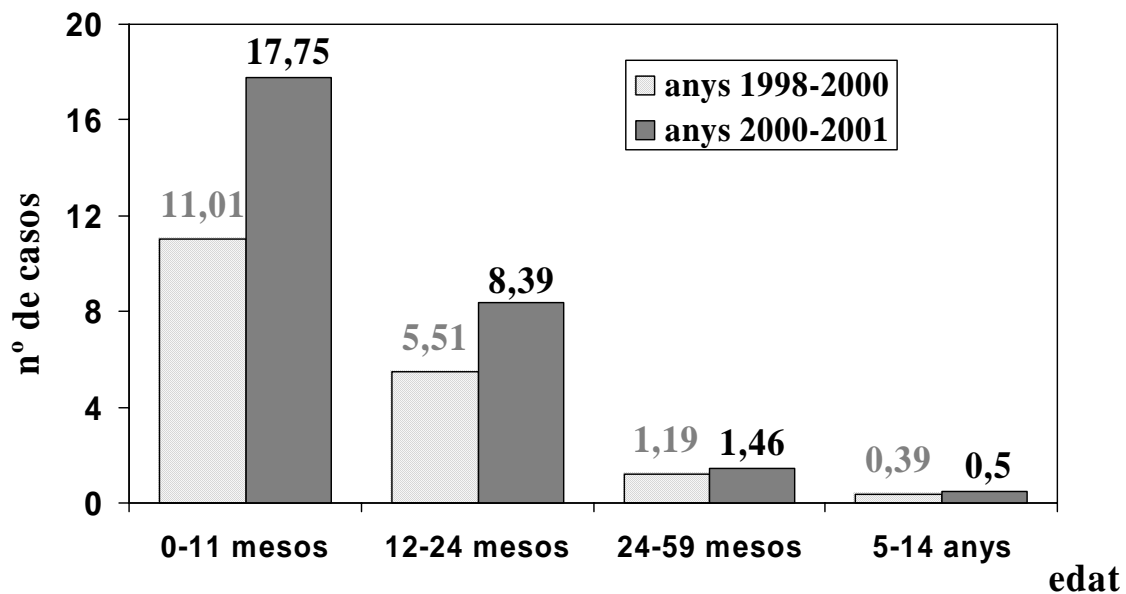


Figura 4. Incidència total (nº de casos/ 100000 nens) de meningitis pneumocòcica segons grups d'edat. Els casos procedeixen de cinc comunitats autònomes: Catalunya, Galícia, Madrid, Navarra i País Basc^{63,65}.

Mortalitat - seqüeles

En els països industrialitzats la meningitis causada per *S. pneumoniae* és la que presenta una taxa de mortalitat més elevada, d'un 20-30% que pot augmentar fins el 40% en la població major de 65 anys. La mortalitat en els més joves s'associa a causes neurològiques mentre que en els malalts majors de 60 anys predominen les complicacions sistèmiques^{2,3}. A més, un 30% dels pacients que sobreviuen pateixen seqüeles que comprenen defectes d'audició, deficiències sensitives-motors, retard mental, alteracions en l'aprenentatge i desordres corporals¹⁻³. En els països en desenvolupament, les dades són encara més dramàtiques: un 50% de nens i adults moren i més d'un 60% pateixen seqüeles⁷¹.

Des de fa molts anys, les xifres que fan referència al pronòstic de la meningitis pneumocòcica són invariables. L'actual coneixement de la seva fisiopatologia suggereix que tant la incapacitat d'eradicar el patògen com la no modulació de la greu resposta inflamatòria que es genera són aspectes crucials en la mortalitat i en el dany cerebral que causen aquesta malaltia^{2, 72,73}.

2.2. FISIOPATOLOGIA

La meningitis pneumocòcica s'associa majoritàriament a un focus inicial (pneumònia, otitis, sinusitis, mastoïditis) i només en un 20% dels casos es presenta com a infecció primària. En general, la invasió bacteriana del LCR té un origen hematogen. No obstant, una invasió no hematògena pot produir-se per l'entrada directa del microorganisme a través d'una fistula que comuniqui la nasofaringe amb l'espai subaracnoïdal, a partir d'infeccions de les vies respiratòries superiors, o en situacions en les quals la integritat de les barreres que envolten el cervell es veu compromesa (neurocirurgia, fractures cranials, defectes congènits de la duramàter).

A continuació es resumeixen seqüencialment les múltiples interaccions pneumococ-hoste que es donen en la patogènesi de la meningitis d'origen hematogen (figura 5)^{74,75}:

- ✧ Adherència i colonització de la nasofaringe
- ✧ Invasió de l'espai intravascular
- ✧ Supervivència i disseminació hematògena: en l'hoste susceptible, *S. pneumoniae* sobreviu gràcies a la protecció antifagocitària que li proporciona la càpsula i a la inhibició de la via alternativa del complement mediada per la proteïna superficial A.
En l'hoste immune, quan es produeix lisi bacteriana s'allibera pneumolisina que activa la via clàssica del complement. Per a controlar l'avenç de la infecció, els macròfags i els leucòcits polimorfonucleats en presència del complement i d'anticossos específics fagociten el pneumococ. En la defensa davant de la bacterièmia, la melsa juga un paper molt important ja que filtra la sang i la depura dels bacteris no opsonitzats.
Si aquests mecanismes són ineficents, la bacterièmia permet l'arribada del pneumococ a zones habitualment estèrils, com és el cas de l'espai subaracnoïdal.
- ✧ Penetració del pneumococ dins el SNC: el bacteri s'adhereix a l'endoteli i travessa les dues barreres fisiològiques que separen el SNC de la resta de l'organisme: la barrera hematocerebral i la BHE.
- ✧ Supervivència i multiplicació en l'espai subaracnoïdal: els mecanismes per a controlar la infecció en l'espai subaracnoïdal estan limitats: els nivells d'immunoglobulines i de complement són mínims i totalment inadequats per opsonitzar i fagocitar els pneumococs encapsulats.

La multiplicació i posterior autòlisi pneumocòcica provoquen l'alliberament de components bacterians amb potencial inflamatori (peptidoglicà, LTA/TAs, pneumolisina, ADN bacterià) al LCR. S'activa la via alternativa del complement i s'inicia la cascada inflamatòria amb la síntesi i alliberament de citoquines proinflamatòries (TNF- α , IL-1 β i IL-6), xemoquines (IL-8), factor activador plaquetari (PAF), metal·loproteïnases de la matriu, prostaglandines (PGE₂) i radicals derivats de l'oxigen, per part de l'hoste. Com a resultat final, es dona una entrada massiva de neutròfils dins del LCR però l'eficàcia fagocitària és subòptima perquè no hi ha hagut prèvia opsonització.

- ✧ Inflamació meníngia promoguda per l'hoste: és responsable de les conseqüències fisiopatològiques que contribueixen a la simptomatologia clínica i a les possibles seqüeles de la malaltia:
 - Augment de la permeabilitat de la BHE: entrada massiva de components plasmàtics \Rightarrow edema vasogènic \Rightarrow augment de la concentració de neutròfils (pleocitosi, ≥ 1000 cèl·lules/mm³) i de proteïnes (> 50 mg/dl) en LCR .
 - Increment de la viscositat del LCR (per influx de components plasmàtics): augment de la resistència al flux normal del LCR (*outflow resistance*) \Rightarrow obstrucció de la sortida de LCR \Rightarrow hidrocefàlia \Rightarrow edema intersticial.
 - Alliberament de factors tòxics per part dels neutròfils i dels bacteris: edema citotòxic. La secreció de PGE₂ també contribueix a l'edema ja que produeix hipotonia del fluid extracel·lular amb el què s'augmenta la permeabilitat del cervell a l'aigua.
- ✧ Vasculitis cerebral: l'augment del volum sanguini en el cervell provoca la inflamació dels vasos sanguinis \Rightarrow estrenyiment de vasos i/o trombosi \Rightarrow disminució del flux sanguini-cerebral \Rightarrow hipòxia \Rightarrow activació metabolisme anaeròbic \Rightarrow augment de la concentració de lactat ($> 4,2$ mmol/l) i disminució dels nivells de glucosa (< 40 mg/dl o un índex glucosa_{LCR}/glucosa_{sèrum} $\leq 0,6$)).
- ✧ Augment de la pressió intracranial (PIC): és conseqüència de l'edema cerebral (vasogènic, citotòxic i intersticial) i de la vasculitis; pot causar hèrnia cerebral o reduir el flux sanguini cerebral \Rightarrow isquèmia que pot derivar a lesions irreversibles o a la mort.

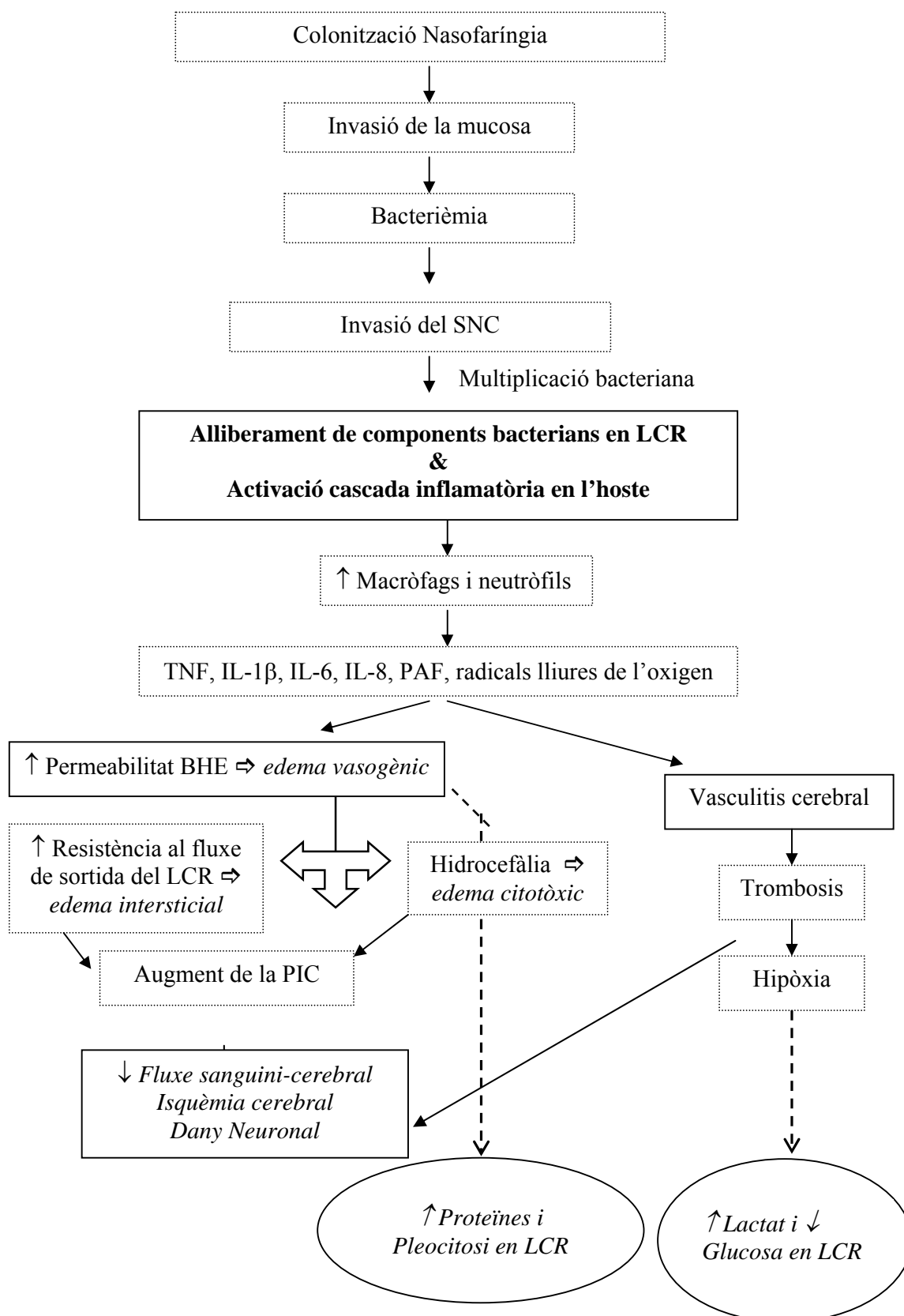


Figura 5. Fisiopatologia de la Meningitis Pneumocòcica

2.3. TRACTAMENT

2.3.1. Aproximació al concepte d'Eficàcia Terapèutica

En l'era preantibiòtica, la meningitis pneumocòcica era una malaltia letal. Avui, tot i disposar d'un potencial terapèutic superior, les dades sobre mortalitat associada es mantenen constants i l'aparició de seqüeles segueix essent un fet freqüent. I és que la millora del pronòstic dels pacients afectats exigeix l'esterilització del LCR però també l'atenuació de la intensa resposta inflamatòria que es genera en l'hoste, vessants que englobaré dins d'un únic objectiu anomenat *eficàcia terapèutica* (figura 6) i que inclourà el tractament antimicrobià i el tractament antiinflamatori.

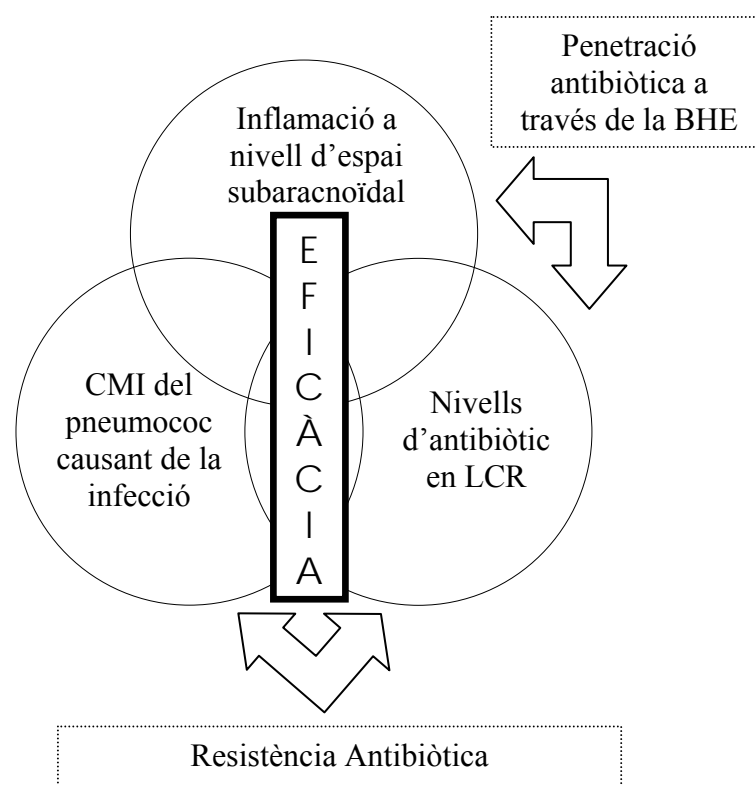


Figura 6. Factors determinants i la seva interacció a l'hora de predir l'eficàcia terapèutica en la meningitis pneumocòcica.

Quines són les relacions que mostra aquesta figura?

- ✓ La relació entre el grau d'inflamació de les meninges i els nivells d'antibiòtic en LCR. Un dels factors que modifica la **penetració antibiòtica** és l'estatus de les meninges. La inflamació de les meninges augmenta la permeabilitat de la BHE i per tant el pas de substàncies com els antimicrobians, i alhora en retarda l'eliminació. La disminució de la inflamació, ja sigui per l'administració de substàncies antiinflamatòries o per l'acció del tractament, redueix la difusió antibiòtica, i per tant és un factor que desaconsella disminuir la dosi d'antibiòtic durant el tractament malgrat s'observi una millora en el pacient.
- ✓ La relació entre els nivells d'antibiòtic i el canvi en la CMI del microorganisme degut a l'adquisició de **resistència antibiòtica** durant el tractament. Està demostrat que una exposició prolongada a un tractament antibiòtic (en general administrat en règim de monoteràpia) augmenta la possibilitat d'aparició de mutants resistents.

Quines són les relacions que no mostra aquesta figura?

- ✓ La resposta inflamatòria total que es desencadena en l'espai subaracnoïdal de l'hoste resulta de la infecció bacteriana i es pot veure més o menys potenciada per l'administració antibiòtica. L'activitat bactericida d'alguns antimicrobians provoca la lisi bacteriana i l'alliberament de components de la paret cel·lular, toxines citoplasmàtiques i ADN bacterià que amplifiquen la cascada inflamatòria.
- ✓ La relació entre els nivells d'antibiòtic assolits en LCR i la CMI (i/o CMB) del microorganisme causant de la infecció és un factor important a l'hora d'aconseguir l'èxit terapèutic. D'aquesta relació en deriven els estudis de **farmacocinètica** i **farmacodinàmia** antibiòtica en sèrum i sobretot en LCR.
Però en la mesura de l'eficàcia també són determinants alguns paràmetres independents dels valors de la CMI/CMB, que podrien explicar l'efecte sobre l'activitat bactericida que tenen concentracions d'antibiòtic creixents en el temps o l'efecte antibacterià que persisteix després d'una exposició antibiòtica (els anomenats efecte postantibiòtic *in vitro* i efecte subCMI *in vivo*).

★ Penetració antibiòtica en el LCR^{60,76}

La capacitat de difusió d'un antibiòtic a través de la BHE depèn de:

- Les seves *característiques físico-químiques*:
 - Pes molecular: com més petita és la substància, major difusió.
 - Grau d'ionització: si la substància és ionitzada, la penetració disminueix.
 - Liposolubilitat: els agents liposolubles (cloramfenicol, rifampicina, quinolones) presenten valors de penetració superiors als menys liposolubles (β -lactàmics i vancomicina).
- La *unió a proteïnes plasmàtiques (Protein Binding)*: com major és el percentatge d'unió, menor és la penetració. No obstant, la unió a proteïnes augmenta la $T_{1/2}$ en sèrum i LCR, i en retarda l'eliminació.
- La *interacció amb el transport actiu de substàncies a través del plexus coroides*: com β -lactàmics i probenecid que competeixen pel mateix sistema de transport.
- El *grau d'inflamació* de les meninges.

★ Resistència Antibiòtica

Una infecció pulmonar causada per un pneumococ amb resistència intermèdia es pot tractar amb èxit amb penicil·lina perquè els nivells assolibles són superiors a la CMI. En canvi, seria impensable utilitzar aquest tractament enfront la mateixa soca en una infecció localitzada com la meningitis. Si la baixa penetració que presenten la majoria d'antibiòtics limita el rang terapèutic òptim, una possible pèrdua de sensibilitat abans o durant el tractament resultaria catastròfica.

La incapacitat d'eradicar soques resistents provoca fracàs terapèutic i indirectament augmenta el risc de disseminació d'aquests mutants entre la població. Knudsen i col·laboradors han observat que l'ús de dosis antibiòtiques inadequades afavoreixen la selecció de mutants resistents en tres models animals d'infecció pneumocòcica⁷⁷. Guillemot *et al.* han demostrat que l'administració de baixes dosis de β -lactàmics en nens durant un període superior a 5 dies incrementa el risc a ser colonitzat per pneumococ resistent⁷⁸.

D'acord amb aquest fet, en els països amb una elevada prevalença de soques resistents es recomana la utilització de dos antibiòtics en combinació per a prevenir el desenvolupament de resistències en el tractament de meningitis pneumocòcica.

★ **Farmacocinètica i Farmacodinàmica Antibiòtica**⁷⁹

En la meningitis, la farmacocinètica d'un antimicrobià estableix l'evolució de la seva concentració en el LCR al llarg del temps, i depèn de la seva absorció, i de la penetració i eliminació a través de la BHE. La farmacodinàmica és la relació entre els nivells assolits en LCR i l'eficàcia i la toxicitat que se'n deriven (figura 7). Els paràmetres farmacocinètics i farmacodinàmics es calculen amb l'objectiu d'establir la dosi, dosificació i via d'administració més adequades per a maximitzar l'eficàcia d'un antibiòtic. S'ha observat dos grups d'antibiòtics segons els paràmetres farmacodinàmics que millor expliquen la seva activitat bactericida:

- Concentració-dependent: la seva eficàcia depèn de la concentració màxima (C_{max}) aconseguida i de la durada de l'efecte postantibiòtic, de manera que el seu efecte augmenta a mesura que les concentracions s'incrementen en el LCR. Permeten llargs intervals de dosificació. Els paràmetres més importants a l'hora de predir l'eficàcia són: C_{max}/CMI (quocient entre la concentració màxima i la CMI); i AUC/CMI : (quocient entre l'àrea sota la corba i la CMI).
- Temps-dependent: la seva eficàcia està condicionada pel temps durant el qual els nivells d'antibiòtic estan per sobre la CMI del microorganisme, el que fa necessari utilitzar intervals d'administració més freqüents. El paràmetre indicador d'eficàcia terapèutica és: $t > CMI$.

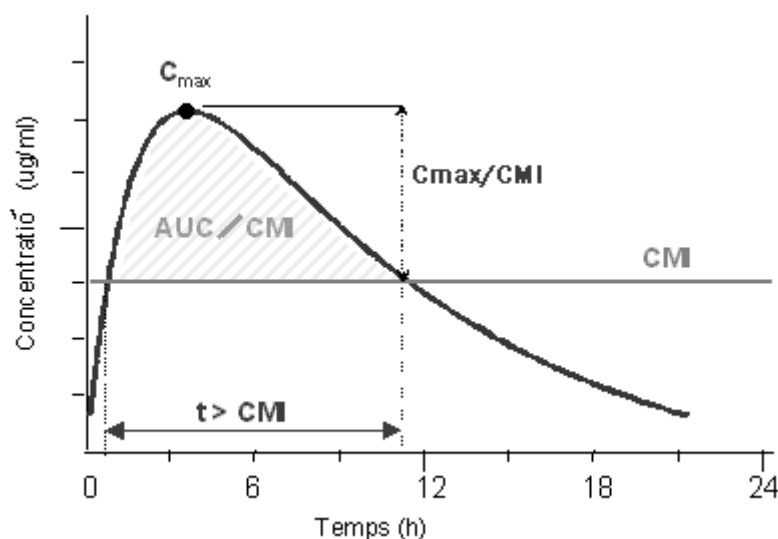


Figura 7. Paràmetres farmacodinàmics predictors d'eficàcia terapèutica.

2.3.2. Teràpia Antimicrobiana

Davant de la sospita de meningitis, l'inici de la teràpia antimicrobiana ha de ser un fet immediat ja que una demora en l'esterilització del LCR empitjora el pronòstic del malalt i augmenta el risc de patir seqüeles⁷³.

Quin és el tractament empíric de la meningitis pneumocòcica?^{60,80-82}

Els β -lactàmics han constituït el tractament estàndard en els últims 40-50 anys gràcies al seu efecte bactericida (correlacionat a concentracions antibiòtiques en LCR entre 8 i 10 vegades per sobre la CMB del pneumococ implicat) que facilita una ràpida esterilització del LCR. La penicil·lina i, en pacients al·lèrgics, el cloramfenicol s'han utilitzat durant molt temps, però l'aparició i disseminació de resistències n'han contraindicat l'ús^{34,83}.

En països amb baixa prevalença de soques PRP, l'administració d'una C3G constitueix una opció segura ja que durant les primeres 24 h la penetració en LCR és màxima i en aquest temps ja estan disponibles els resultats de sensibilitat antibiòtica per si fos necessari modificar la pauta inicial. Cefotaxima pot ser administrada via iv. a dosis elevades sense risc de toxicitat: 50 mg/kg/6h en nens i 75-100 mg/kg/6h (fins a un màxim de 24 g/d) en adults. Ceftriaxona pot ser administrada a dosis de 50-100 mg/kg/d en nens i adults, però fins a un màxim de 4 g/d a partir dels quals podrien aparèixer efectes secundaris. Aquest fet limitaria la dosi en adults que mai podria arribar a ser de 100 mg/kg/d. Ambdues mantenen una bona activitat antipneumocòcica i assoleixen uns nivells adequats en LCR en presència de meningis inflamades amb un rang terapèutic òptim davant de soques amb una CMI a penicil·lina i a C3G de fins a 1 $\mu\text{g/ml}$ ^{4,84,85}.

En pacients al·lèrgics, s'aconsella l'ús de vancomicina acompanyat de la monitorització dels nivells vall en sang (5-10 mg/l) per l'estret marge toxicoterapèutic que presenta. Vancomicina a dosis elevades (15 mg/kg/6h) s'administra via iv. sense toxicitat en nens el que permet assolir uns nivells en LCR òptims per a l'esterilització del LCR. En adults, les dosis tolerables són inferiors (15 mg/kg/12h) i la penetració de vancomicina en l'espai subaracnoïdal, que depèn del grau d'inflamació de les meningis, es pot veure modificada en un mateix malalt durant el tractament, propiciant la possibilitat de fracàs terapèutic. En casos excepcionals, vancomicina es pot administrar via intratecal ja que ha demostrat la seva eficàcia en meningitis per pneumococ resistent⁶.

En àrees geogràfiques amb un índex elevat de resistència, la utilització de monoteràpies es veu compromesa per dues raons:

- perquè la variació individual en els nivells de C3G assolits en LCR amb les dosis convencionals és tan gran que no assegura que la concentració d'antibiòtic sigui òptima^{5,6,86,87}.
- perquè la descripció de soques de pneumococ altament resistents a C3G (CMI > 4 µg/ml) augmenta encara més les possibilitats de fracàs terapèutic^{7,10-13}.

En aquestes regions, el tractament empíric recomanat consisteix en la combinació de cefotaxima/ceftriaxona més vancomicina. Alguns autors han recomanat l'ús de cefotaxima/ceftriaxona més rifampicina. S'aconsella administrar cefotaxima a dosis elevades per a cobrir terapèuticament soques amb una CMI de fins a 2 µg/ml. En pacients al·lèrgics, el tractament empíric el constitueix vancomicina 15 mg/kg/12h combinada amb rifampicina 15 mg/kg/d.

Algunes consideracions dins l'evolució de la malaltia

La durada del tractament antibiòtic oscil·la entre 10 i 14 dies. Si el pneumococ causant és resistent a β-lactàmics, s'ha de realitzar una nova punció lumbar per a comprovar l'esterilització del LCR a les 24-36 h de la primera dosi antibiòtica⁸⁸. En cas d'obtenir cultius positius, s'haurien de considerar altres opcions terapèutiques.

Quines són les alternatives per si el tractament empíric no és l'adequat?

Dins de la família dels β-lactàmics, els carbapenems han estat objecte d'estudi. Si imipenem ha estat descartat pel seu efecte convulsionant⁸⁹, meropenem sol o combinat amb ceftriaxona, vancomicina o levofloxacino ha demostrat ser actiu *in vitro/in vivo* davant de soques resistents a penicil·lina i sensibles a C3G⁹⁰⁻⁹². En un treball recent, meropenem en solitari i combinat amb vancomicina no va aconseguir l'esterilització del LCR en el 100% dels conills infectats amb un pneumococ resistent a C3G (CMI = 4 µg/ml)⁹³. Un altre candidat, ertapenem, ha mostrat una activitat antipneumocòcica similar als tractaments estàndard en la meningitis experimental per soques sensibles/resistents a penicil·lina⁹⁴.

Als darrers deu anys s'han desenvolupat molts treballs experimentals per a valorar l'eficàcia de noves molècules de la família de les fluoroquinolones. En la meningitis experimental produïda per soques resistents a penicil·lina i a C3G (CMI = 4 µg/ml), garenofloxacino⁹⁵,

gatifloxacino⁹⁶, moxifloxacino⁹⁷ i trovafloxacino⁹⁸ mostren una excel·lent penetració en LCR però no milloren significativament l'activitat de ceftriaxona i vancomicina en solitari o combinades. D'altra banda, el seu ús contraindicat en nens i l'augment progressiu de la CMI vers *S. pneumoniae* relacionat directament amb un consum incrementat en la comunitat redueixen encara més les expectatives de convertir-se en un referent.

L'elecció del tractament empíric davant d'un cas de meningitis causat per una soca amb un grau elevat de resistència (CMI > 4 µg/ml) és un problema no resolt. Els pocs casos clínics apareguts dificulten la valoració estadística de les teràpies convencionals^{10,11,13}. Amb la finalitat de trobar el millor candidat, caldria apostar per l'estudi de combinacions antibiòtiques ja que permeten ampliar l'espectre antimicrobià, obtenir una eficàcia optimitzada, reduir el risc de desenvolupament de resistències que presenta l'ús de monoteràpies i disminuir el risc de fracàs terapèutic en els casos on s'administrin substàncies inflamatores amb efecte modulador de la penetració antibiòtica a través de la BHE.

2.3.3. Tractament Antiinflamatori

La resposta de l'hoste a la lisi bacteriana es tradueix en l'amplificació d'una cascada inflamatòria que si no es modula pot provocar isquèmia, lesió cerebral i mort del malalt. A diferència del que succeeix amb l'arsenal antimicrobià, només la dexametasona ha aconseguit superar el rigorós procés que la capacita com a substància antiinflamatòria eficaç en la meningitis. En el nostre hospital s'administra de forma adjuvant al tractament antimicrobià des del 1987 amb bons resultats.

Quin és el paper de la dexametasona en el pronòstic de la meningitis pneumocòcica?

Un primer aspecte a considerar és que els beneficis de la dexametasona només es poden apreciar si s'administra abans (10-20') o conjuntament amb la primera dosi antibiòtica.

En el model experimental la dexametasona va reduir la inflamació en l'espai subaracnoïdal millorant els símptomes neurològics⁹⁹⁻¹⁰¹. En un metaanàlisi de diversos assaigs clínics i més recentment en dos estudis de 120 i 112 casos de meningitis pneumocòcica en nens i adults, respectivament, l'administració primerenca de dexametasona va protegir del desenvolupament de dèficits auditius¹⁰² i d'un pronòstic greu, a més d'associar-se a una menor mortalitat^{58,103}. El *European Dexamethasone in Adulthood Bacterial Meningitis Study Group* va demostrar en una sèrie de > 300 casos que el tractament adjuvant amb dexametasona disminuïa la mortalitat¹⁰⁴. Quan s'ha estudiat aquest efecte beneficiós s'ha vist que seria atribuïble a la millora de les complicacions sistèmiques però no a les de tipus neurològic^{103,105}.

L'ús concomitant de dexametasona amb el tractament antimicrobià no està exempt d'inconvenients:

- en els models experimentals de meningitis en rata i conill, dexametasona va potenciar processos d'apoptosi neuronal que van derivar en dèficits d'aprenentatge^{106,107}.
- en alguns estudis clínics no va aportar cap benefici a l'hora de prevenir complicacions neurològiques^{1,104}.
- en el model animal, l'administració conjunta de dexametasona amb vancomicina va disminuir significativament la seva penetració a través de la BHE donant-se retard en l'eradicació del pneumococ^{100,108}.

Què recomanen els experts?

Les directrius sobre l'ús de la dexametasona en meningitis pneumocòcica estan clarament diferenciades segons l'edat del pacient^{60,82,103}. No obstant, la variabilitat en els resultats obtinguts provoca un constant desacord entre els experts en meningitis bacteriana.

- No es recomana la seva administració en el període neonatal ja que l'espectre dels microorganismes causants de meningitis no inclou *H. influenzae*, *S. pneumoniae* i *N. meningitidis* i per tant, els resultats obtinguts amb aquests no són extrapolables.
- En nens > 6 setmanes d'edat, es recomana considerar els riscos i beneficis que se'n puguin derivar. En cas d'administració: dosis de 0,6 mg/kg/d fraccionades cada 6-12 h de dos a quatre dies.
- Només en adults, les opinions basades en els bons resultats en la millora del pronòstic s'agrupen en un consens a l'hora de recomanar l'administració d'una dosi de 0,15 mg/kg/6h de dexametasona de dos a quatre dies.

L'efecte de la dexametasona en la disminució de la permeabilitat de la BHE i conseqüentment, dels nivells d'antibiòtics hidrofílics en LCR és un punt especialment espinós en el supòsit de soques amb resistència antibiòtica on les possibilitats de fracàs terapèutic amb les combinacions que inclouen vancomicina es veurien incrementades. A la clínica, els resultats són divergents: en nens amb meningitis bacteriana, la dexametasona no va reduir els nivells de vancomicina en el LCR⁸⁷. No obstant, s'han documentat fracassos en adults que van rebre vancomicina i dexametasona⁸⁶. Dins d'aquest context, alguns experts recomanen l'addició de rifampicina a C3G o la triple combinació C3G més vancomicina més rifampicina, quan s'administri dexametasona de forma adjuvant en base a que la penetració de rifampicina i ceftriaxona en LCR no es veuria modificada¹⁰⁰.

Quines són les alternatives de les què disposem?

La millora en el coneixement del paper que citoquines, xemoquines i agents oxidants juguen en les complicacions neurològiques de la meningitis ha proporcionat la base pel desenvolupament de nous candidats.

De les troballes en estudis experimentals, la més remarcable i que podria provar-se en humans pròximament, la constitueix l'antioxidant N-acetilcisteïna que ha demostrat ser capaç de reduir l'edema cerebral, la pressió intracranial i la pleocitosi a les 24 h postinfecció sense efectes adversos^{109,110}.

2.4. MODEL D'INFECCIÓ EXPERIMENTAL

2.4.1. L'Experimentació Animal com a Eina de Recerca

Durant molt temps s'han utilitzat animals per avaluar activitat, toxicitat, teratogenicitat i irritabilitat de diferents productes, entre ells cosmètics. Com a resposta, una part de la societat s'ha declarat en contra de l'experimentació animal.

El primer indici de reflexió dins la comunitat científica es va traduir en l'establiment de directrius de treball, de les quals la més coneguda és el concepte de les tres Rs de Russell & Burch¹¹¹:

- *Reducció del nombre d'animals*: Com? Definint les condicions que puguin augmentar la variabilitat dels resultats, com per exemple l'ús d'animals cosanguinis, amb un petit interval de pes ... A nivell d'investigador, hi ha una clara controvèrsia entre aquesta directriu i l'anàlisi estadístic que fomenta una major *N*.
- *Refinament de l'estudi*: Com? A nivell del protocol d'estudi (tria de l'espècie animal adequada, el període d'estudi) o respecte l'animal (amb tècniques per a minimitzar el seu dolor i/o estrès).
- *Reemplaçament de l'ús d'animals*. Com? Utilitzant mètodes alternatius (models *in vitro*, cultius cel·lulars, simuladors matemàtics ...) sempre que sigui possible.

Avui, el binomi recerca i benestar animal en qualsevol disseny experimental és una pràctica ben regulada a Catalunya. La legislació sobre l'ús i protecció d'animals destinats a experimentació i altres finalitats científiques es regeix a nivell autonòmic pel Decret 214/1997 de 30 de juliol (DOGC núm. 2450, 7 d'agost, pàg. 9169) i a nivell estatal pel Real Decreto 1201/2005, de 10 d'octubre de 2005 (<http://www.boe.es/boe/dias/2005/10/21/pdfs/A34367-34391.pdf>).

Des de la sortida de l'animal procedent d'un centre de cria acreditat per la Generalitat fins a la seva arribada a l'estabulari, el protocol de treball que inclou aquest animal és estudiat, discutit, modificat i en el millor dels casos, aprovat per un Comitè Avaluador d'Experimentació Animal.

A més a més, el personal que treballa directament amb els animals (investigadors, tècnics, personal d'estabulari) requereix la realització d'un curs de formació com a usuaris d'animals d'experimentació.

2.4.2. Models Animals d'Infecció: Meningitis Experimental^{75,79}

Tot i respectar les consideracions ètiques que una part de la societat promou en contra de l'ús d'animals amb finalitat experimental, cal remarcar que els models animals d'infecció són la base dels assaigs preclínic que es duen a terme per a comercialitzar un nou antibiòtic, segons la FDA i l'Agència Europea per a l'Avaluació de Productes Medicinals ja que no es disposa de cap mètode alternatiu que pugui substituir-los.

Els models animals d'infecció s'utilitzen perquè tenen una posició ben definida entre els estudis *in vitro* i la clínica. El principal avantatge respecte als models *in vitro* és que es desenvolupen en unes condicions més properes a la realitat, en un ambient menys favorable que un brou de cultiu i interaccionant amb els múltiples factors de l'hoste. D'altra banda, reproduïen fidelment les característiques de les infeccions humanes i alhora permeten una anàlisi fiable de les múltiples variables que es poden estudiar (patogènesi, resposta immunitària, eficàcia del tractament antimicrobià). Dins de la valoració de l'eficàcia terapèutica, encara que les diferències entre la farmacocinètica humana i animal són evidents, els paràmetres farmacodinàmics dels antibiòtics incorporen aquestes diferències permetent una comparació interespecie.

Un dels avantatges dels models animals és la seva aplicabilitat en infeccions poc comuns entre la població, com és el cas de la meningitis. La informació que s'obté del model de meningitis experimental depèn del **tipus d'inoculació**:

- Inoculació intranasal¹¹², intravenosa¹¹³ o intraperitoneal¹¹⁴ permet l'estudi de les primeres etapes de la patogènesi de la meningitis d'origen hematogen.

Limitacions: - Només una part dels animals (≈ 50%) desenvolupen la malaltia.

- El temps necessari d'inici de la malaltia és variable (≥ 1 dia).

- Risc elevat de mortalitat animal deguda a un xoc sèptic.

- Inoculació intracisternal¹¹⁵, permet l'estudi de la meningitis que s'ha originat en un focus intracranial, a partir d'infeccions de vies respiratòries superiors o per inoculació traumàtica dins del SNC. Ha contribuït al coneixement de la fisiopatologia de la malaltia, a l'estudi dels mecanismes causants de la resposta inflamatòria i la seva modulació, i a l'avaluació de noves possibilitats terapèutiques especialment des de l'aparició de soques resistents.

Avantatges: - La meningitis es desenvolupa en un temps predicible i amb una major fiabilitat.

- Limitacions:
- El patogen no es dissemina per via hematògena, per tant la bacterièmia es desenvolupa de forma secundària.
 - No permet estudiar les primeres etapes de la patogènesi.
 - Risc d'èxitus per complicacions neurològiques o sistèmiques.

L'elecció de l'*animal* constitueix un punt important en el desenvolupament del model. Els animals de tamany petit (ratolí, rata, conill porquí) tenen limitat el volum de LCR i/o sang que es pot obtenir en cada mostra, a més a més de no permetre extraccions seriades en un mateix animal.

2.4.3. Model de Meningitis Pneumocòcica en Conill

El model experimental de meningitis en conill, desenvolupat per Dacey i Sande l'any 1974, segueix essent en l'actualitat una eina indiscutible en la recerca d'alternatives terapèutiques i en l'estudi del procés inflamatori que es genera paral·lelament a la infecció.

Aquest model va ser innovador per la infraestructura utilitzada: l'aparell d'estereotàxia que, des del punt de vista metodològic, facilita la presa de mostres de LCR per la via intracisternal.

El fet d'utilitzar un animal de gran tamany com és el conill afegeix clars avantatges com el fet de poder obtenir mostres d'un mateix animal en diferents punts horaris i poder extreure un volum de LCR suficient per a poder valorar tant concentracions bacterianes com paràmetres inflamatoris.

Com a limitacions, és un model que no reproduïx la patogènesi de la meningitis d'origen hematogen. A més, la punció repetitiva en l'espai subaracnoïdal pot provocar lesions importants i en el pitjor dels casos la mort de l'animal.

3. ANTIMICROBIANS

3.1. CEFTRIAXONA

És una C3G d'estructura semisintètica disponible en la pràctica mèdica des dels anys 80.

Mecanisme d'acció: s'uneix específicament a les proteïnes PBP1a, PBP2x i PBP2a, i les inactiva irreversiblement bloquejant la darrera etapa de la síntesi del peptidoglicà.

3.1.1. Farmacocinètica i Farmacodinàmia en sèrum i LCR

Presenta unes característiques farmacocinètiques particulars envers la resta de β -lactàmics:

- Unió a proteïnes elevada (95%) i saturable, que contribueix a una elevada $T_{1/2}$ (en LCR: 7-8 h en conills i \approx 17 h en humans)^{116,117} i permet una còmoda dosificació en forma d'unidosi. A més, la saturació dels llocs d'unió a proteïnes contribueix a una major fracció lliure (i per tant, activa) de ceftriaxona en sèrum i teixits. Aquestes dades contrasten amb els valors d'un 35% d'unió a proteïnes, una $T_{1/2} = 1,2$ h i un interval de dosificació de 8 h que presenta la cefotaxima¹¹⁸.
- Excel·lent penetració tissular essent adequada en el LCR en presència de meninges inflamades: 4-11% en humans i 3-15% en conills (taula 4). Aquesta penetració disminueix fins un 1-5% quan la inflamació desapareix¹¹⁸.

Els paràmetres farmacodinàmics més importants en relació a l'eficàcia de la ceftriaxona són $t >CMI$ i $t >CMB$, tal i com s'ha demostrat en estudis *in vitro* i en models animals^{117,122,123}. A nivell quantitatiu, el $t >CMI$ necessari per aconseguir un efecte bacteriostàtic *in vitro* és d'un 35-40% de l'interval de dosificació, mentre que l'efecte màxim s'observaria amb valors d'un 60-70%¹²³. En el model experimental de meningitis pneumocòcica, es va evidenciar efecte bactericida quan la concentració de ceftriaxona en LCR superava la CMB durant un temps \geq 95% de l'interval de dosificació¹¹⁷. Aquesta correlació, que només és factible en meningitis causades per pneumococs amb una CMI a ceftriaxona ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$, explicaria els fracassos terapèutics associats a soques amb un major nivell de resistència. Les diferències quantitatives entre estudis *in vitro* i *in vivo* respecte el $t >CMB$ es poden atribuir a la major durada de l'efecte postantibiòtic que la ceftriaxona presenta *in vitro* envers el pneumococ¹¹⁸.

| | Dosi iv. | Nivells pic sèrum (µg/ml) | Nivells pic LCR (µg/ml) | Referència |
|----------------|-----------|------------------------------|----------------------------|------------|
| HUMANS | 50 mg/kg | 54 ± 17 | 6,6 ± 4,5 | 87 |
| | 75 mg/kg | 137 ± 39 | 5,7 ± 1,4 | 119 |
| | 100 mg/kg | 93 ± 53,4 | 8,8 ± 8,2 | 87 |
| CONILLS | 75 mg/kg | 275 ± 59 | 5,5 ± 3,7 | 100 |
| | 100 mg/kg | 193,1 ± 77,09 | 5,7 ± 1,5 | 120 |
| | 125 mg/kg | 195 ± 54 | 4,9 ± 1,7 | 121 |
| | 150 mg/kg | 236 ± 36 | 5,3 ± 1,4 | 117 |

Taula 4. Nivells pic de ceftriaxona en humans amb meningitis bacteriana i en conills amb meningitis pneumocòtica.

3.1.2. Indicació en el tractament de meningitis pneumocòtica

La dosi de ceftriaxona tolerable en humans no excedeix els 4 g/d, de manera que en nens pot ser administrada fins a 100 mg/kg/d, però no en adults. Partint d'aquest punt, l'assoliment de nivells fiables en LCR explica l'eficàcia davant de pneumococs amb una CMI = 0,1-1 µg/ml a penicil·lina i sensibles a C3G^{1,87,124}. En meningitis per soques amb una CMI superior, ceftriaxona provoca fracassos terapèutics^{5, 87}.

A la fase inicial de tractament, la seva acció bactericida sobre la paret cel·lular produeix una ràpida lisi bacteriana i l'alliberament de productes amb un clar efecte proinflamatori¹⁸. Si es comparen els avantatges i inconvenients d'aquest *killing*, s'observa que el creixement bacterià incontrolat generaria una major quantitat de fragments de paret cel·lular circulants que el que podria ocasionar el tractament antimicrobià. Per tant, el benefici d'eradicar el patogen de forma immediata supera el conjunt d'efectes col·laterals que es puguin derivar d'una inflamació brusca mediada per β-lactàmics.

L'administració conjunta amb dexametasona redueix l'activitat i la penetració de ceftriaxona en l'espai subaracnoïdal en el model experimental produït per soques resistents (CMI a C3G entre 1-4 µg/ml)^{100,108,125}, fet que comprometria l'eficàcia de la monoteràpia en casos relacionats amb soques amb un grau de resistència superior.

3.2. FOSFOMICINA

És un antibiòtic d'estructura simple, d'ampli espectre, aïllat per primera vegada l'any 1966 d'una soca de *Streptomyces fradiae*. També es pot obtenir de la fermentació de *S. viridochromogenes* i de la de *S. wedmorensis*.

Mecanisme d'acció: bloqueja un dels enzims que participen en la primera etapa de la síntesi del peptidoglicà impeding la formació de UDP-N-Acetilmuràmic.

La fosfomicina penetra dins del bacteri mitjançant permeases transportadores de D-Glucosa-6-Fosfat. Per aquesta raó, és necessari afegir una quantitat de G6P en els estudis de sensibilitat i en la determinació de nivells d'antibiòtic.

3.2.1. Farmacocinètica i Farmacodinàmia en sèrum i LCR

Fosfomicina no s'uneix a proteïnes plasmàtiques ($T_{1/2} = 1-2$ h). Gràcies al seu baix pes molecular presenta un ampli volum de distribució i travessa amb facilitat la BHE: 23-60% en humans i 55% en conills (taula 5). Amb la remissió de l'estatus inflamatori l'entrada en LCR minva fins a la meitat dels valors obtinguts en presència de meninges inflamades^{126,129}.

Administrada a dosis terapèutiques, no produeix trastorns hepàtics, renals ni hematògics significatius, pel què es pot dir que és pràcticament atòxica. No presenta hipersensibilitat creuada amb altres antibiòtics esdevenint un fàrmac vàlid en pacients amb al·lèrgia a β -lactàmics.

El perfil farmacodinàmic de la fosfomicina no està ben definit. Alguns estudis han especulat amb la possibilitat que la seva eficàcia en múscul i en teixits tous sigui temps-dependent^{130,131}. Pfausler *et al.* han demostrat el mateix comportament en LCR de pacients de neurocirurgia i han correlacionat l'activitat bactericida antiestafilocòcica de fosfomicina amb un $t > CMI$ superior al 60%¹²⁹. D'altra banda, en la meningitis experimental van ser necessaris concentracions pic de fosfomicina d'almenys 10 vegades per sobre la CMI del pneumococ per a evidenciar un efecte bactericida¹²⁸.

| | Dosi iv. | Nivells sèrum (µg/ml) | Nivells LCR (µg/ml) | Referència |
|----------------|-------------|--------------------------|------------------------|------------|
| HUMANS | 0,5 g/6h | 84,1 ± 59,5 | 51,95 ± 37,6 | 126 |
| | 4 g/6h | 96,02 ± 43,3 | 52,4 ± 22,4 | 126 |
| | 4 g/6h | 184,3 ± 41,7 | 47,4 ± 22,02 | 127 |
| CONILLS | 10 mg/kg/h | 69,4 | 18,4 | |
| | 40 mg/kg/h | 208 | 131 | 128 |
| | 80 mg/kg/h | 518 | 247 | |
| | 160 mg/kg/h | 814 | 350 | |

Taula 5. Nivells de fosfomicina en humans amb meningitis bacteriana i en conills amb meningitis pneumocòcica.

3.2.2. Indicació en el tractament de meningitis pneumocòcica

L'excel·lent penetració en l'espai subaracnoïdal i l'ampli espectre d'activitat bacteriana que presenta la caracteritzen com a possible candidat en el tractament d'infeccions del SNC. No obstant, el seu ús en monoteràpia queda descartat per dues raons. La CMI del pneumococ a fosfomicina és elevada, amb un augment proporcional a la pèrdua de sensibilitat a penicil·lina¹³² i en general, està en el mateix rang de valors que els nivells assolibles en LCR. A més, l'adquisició de resistència (per alteració de la permeabilitat de la paret cel·lular o per desactivació enzimàtica) és un fenomen freqüent durant el tractament.

Per a evitar la selecció de mutants resistents, s'ha estudiat un possible sinergisme amb altres antibiòtics. L'addició de fosfomicina a ampicil·lina o penicil·lina és sinèrgica¹²⁷ com també ho és l'associació amb cefotaxima o ceftriaxona davant de *S. pneumoniae* amb diferent sensibilitat a β-lactàmics^{133,134}. La combinació amb ceftriaxona ha mostrat efecte additiu en el model de meningitis pneumocòcica¹²⁸ i s'ha associat a èxit terapèutic en meningitis postquirúrgiques en adults^{135,136}. Des de 1987, alguns autors francesos han utilitzat la combinació amb cefotaxima com a tractament empíric de la meningitis nosocomial per la seva excel·lent activitat antiestafilocòcica i antienterobacteriana¹³⁷. En cap cas s'ha descrit selecció de mutants resistents durant el tractament combinat.

3.3. RIFAMPICINA

És un antibiòtic produït per *Streptomyces mediterranei* comercialitzat des de l'any 1965.

Mecanisme d'acció: inhibeix la transcripció i posterior síntesi del ARN mitjançant la unió no covalent a la subunitat β de l'ARN polimerasa bacteriana.

3.3.1. Farmacocinètica i Farmacodinàmia en sèrum i LCR

En sèrum presenta una unió a proteïnes d'un 80%. Gràcies al seu caràcter liposoluble assoleix concentracions tissulars similars a les plasmàtiques, essent la penetració en LCR d'un 7-56% en humans i d'un 18-22% en conill (taula 6). Una $T_{1/2} \approx 14,5$ h en LCR permet una administració en unidosi en el tractament d'infeccions del SNC.

La correlació entre els nivells de rifampicina i la seva activitat bactericida/bacteriostàtica és paradoxal. En la meningitis experimental, s'ha observat una correlació positiva entre la concentració de rifampicina en LCR i l'efecte de les dosis de 5 i 10 mg/kg, però no en una dosi de 20 mg/kg que va resultar menys activa¹³⁹. També en el tractament de la tuberculosi, una dosi de 600 mg/d de rifampicina va ser més eficaç que una de 750 mg/d¹⁴⁰.

| | Dosi iv. | Nivells pic sèrum (µg/ml) | Nivells pic LCR (µg/ml) | Referència |
|----------------|-----------|------------------------------|----------------------------|------------|
| HUMANS | 20 mg/kg | 5,1 ± 3,0 | 1,0 ± 0,5 | 87 * |
| | 7,5 mg/kg | 2,16 | 0,206 | 141 # |
| | 10 mg/kg | 3,84 | 0,178 | 141 # |
| CONILLS | 10 mg/kg | 23,1 ± 9,7 | 0,8 ± 0,3 | 139 |
| | | 23 ± 3,8 | 0,5 ± 0,2 | 93 |
| | 15 mg/kg | 21 ± 4 | 0,4 ± 0,1 | 120 |
| | | 19 ± 5 | 0,4 ± 0,3 | 121 |
| | 20 mg/kg | 66 ± 26,5 | 1,9 ± 0,8 | 139 |

Taula 6. Nivells pic de rifampicina en humans amb meningitis (*bacteriana i # tuberculosa) i en conills amb meningitis pneumocòcica.

3.3.2. Indicació en el tractament de meningitis pneumocòtica

En condicions de pretractament, la majoria de pneumococs són sensibles a rifampicina. A partir d'aquest punt el que esperàriem és que la seva activitat antipneumocòtica fos equivalent a la d'altres antibiòtics com ceftriaxona o vancomicina. No obstant, això no és *del tot cert*.

Existeix una clara discordança entre l'activitat antipneumocòtica de rifampicina *in vitro* i en el model animal¹⁴². L'efecte bacteriostàtic que s'aprecia *in vitro* no es correlaciona amb l'activitat bactericida observada amb una dosi de 15 mg/kg/d en la meningitis experimental en conill^{90, 93, 120, 144}.

Però la principal limitació que presenta rifampicina per ser administrada en monoteràpia és la facilitat amb què es desenvolupa resistència durant el tractament¹⁴⁵. Les soques resistents presenten mutacions puntuals en gens codificants per l'ARN polimerasa el què els proporciona un nivell baix de resistència (CMI: $\geq 0,5$ i < 4 $\mu\text{g/ml}$); la transferència horitzontal d'aquestes alteracions seria un pas determinant en l'adquisició d'un grau superior de resistència¹⁴⁶.

Com a antibiòtic que actua a nivell de síntesi proteica, promou una activació de la cascada inflamatòria molt més retardada que els antimicrobians que actuen a nivell de paret cel·lular. Rifampicina indueix una resposta inflamatòria atenuada en l'espai subaracnoïdal de ratolí i conill i redueix la mortalitat en el model murí de meningitis comparada amb ceftriaxona¹⁴⁷. L'efecte modulador respon a un menor o més lent alliberament de LTA/TAs i d'ADN bacterià i a una producció minvada de radicals derivats de l'oxigen en el LCR^{19,147-149}. A més a més, rifampicina exhibeix una bona difusió en l'espai subaracnoïdal que no es veu modificada en presència de dexametasona^{100,120,144}. Aquests bons resultats van a favor de la recomanació d'afegir rifampicina al tractament estàndard ceftriaxona/vancomicina davant de meningitis causades per soques resistents^{100,144}.

3.4. TEICOPLANINA

És un glicopèptid aïllat de *Actinoplanes teichomyceticus* (any 1978) amb espectre restringit a gram positius.

Mecanisme d'acció: inhibeix la síntesi del peptidoglicà durant la segona etapa, fase prèvia al moment en què actuen els β -lactàmics. Aquest fet justifica l'absència de resistència creuada.

3.4.1. Farmacocinètica i Farmacodinàmia en sèrum i LCR

L'elevada unió a proteïnes (90%) deriva en una $T_{1/2} \approx 150-180$ h que permet administrar-la en una dosi diària. La seva eliminació renal requereix ajustament de dosi en pacients renals però té menys efectes secundaris que vancomicina¹⁵⁰.

El paràmetre farmacodinàmic que ha demostrat millor correlació amb la seva activitat antipneumocòcica és C_{max}/CMI , tot i que el $t > CMI$ també hi influeix¹⁵¹.

3.4.2. Indicació en el tractament de meningitis pneumocòcica

En principi no és un bon candidat en infeccions del SNC per la seva escassa penetració en LCR (taula 7). Això explicaria per què no hi ha experiència clínica en meningitis pneumocòcica malgrat s'hagi demostrat que l'activitat *in vitro* de teicoplanina davant de *S. pneumoniae* és millor que la de vancomicina¹⁵⁴.

Només un treball ha valorat positivament la seva eficàcia en el model en conill. Tot i que l'administració conjunta de dexametasona va reduir la seva penetració en LCR, l'eficàcia no es va veure afectada¹⁵³.

| | Dosi iv. | Nivells pic sèrum ($\mu\text{g/ml}$) | Nivells pic LCR ($\mu\text{g/ml}$) | Referència |
|----------------|----------|---|---|------------|
| HUMANS | | 14,5 | 1,3 | 152 |
| | 400 mg | 23 | 0,3 | |
| | | 7,2 | 0,3 | |
| CONILLS | 15 mg/kg | 73,58 \pm 12,99 | 1,09 \pm 0,93 | 153 |

Taula 7. Nivells pic de teicoplanina en humans amb meningitis bacteriana i en conills amb meningitis pneumocòcica.

3.5. VANCOMICINA

És un glicopèptid obtingut de *Streptomyces orientali* l'any 1956, d'efecte bactericida sobre gram positius.

Mecanisme d'acció: inhibeix la segona etapa de la síntesi del peptidoglicà a través del bloqueig de la transglucosilació i transpeptidació dels precursors. Secundàriament pot actuar alterant la permeabilitat de la membrana i inhibint la síntesi proteica.

3.5.1. Farmacocinètica i Farmacodinàmia en sèrum i LCR

La farmacocinètica és simple: baixa unió a proteïnes (30-50%) i una $T_{1/2}$ = 6-8 h en pacients amb funció renal adequada. L'eliminació per filtració glomerular afavoreix la seva acumulació en pacients amb insuficiència renal el què obliga a ajustar la dosi i monitoritzar els nivells vall en sang¹⁵⁰.

La seva penetració a través de la BHE en presència de meninges inflamades és d'un 7-15% en humans i d'un 10-20% en conills (taula 8). A mesura que la inflamació desapareix l'entrada en LCR és redueix dràsticament^{155, 156}.

| | Dosi iv. | Nivells pic sèrum (µg/ml) | Nivells pic LCR (µg/ml) | Referència |
|----------------|----------|------------------------------|----------------------------|------------|
| HUMANS | 60 mg/kg | 17,3 ± 6,7 | 3,3 ± 1,1 | 87 |
| CONILLS | 20 mg/kg | 35 ± 4 | 2,3 ± 0,8 | 121 |
| | | 34,7 ± 5,3 | 0,9 ± 0,5 | 120 |
| | | 37 ± 12 | 1,2 ± 1,2 | 93 |
| | | 25,2 ± 5,6 | 1,8 ± 1,4 | 155 |

Taula 8. Nivells pic de vancomicina en humans amb meningitis bacteriana i en conills amb meningitis pneumocòcica.

Vancomicina es considera un antibiòtic amb una activitat bactericida temps-dependent i un efecte postantibiòtic de curta durada, pel què una dosificació continuada o fraccionada permet una esterilització més ràpida que una única dosi^{121,151}. No obstant, el paràmetre farmacodinàmic que va justificar la seva eficàcia en la meningitis pneumocòcica experimental va ser AUC/CMB. En el model animal es va demostrar que tan important és

aconseguir uns nivells d'almenys quatre vegades per sobre la CMB com mantenir-los en aquest rang durant el major temps possible, especialment fins al final de l'interval de dosificació¹⁵⁵.

3.5.2. Indicació en el tractament de meningitis pneumocòcica

Fins avui, cap soca de pneumococ estudiada ha presentat resistència a vancomicina el que corrobora l'excel·lent activitat que exhibeix *in vitro* i en el model animal de meningitis pneumocòcica, sempre i quan els nivells siguin els adequats segons la seva farmacodinàmia^{90,93,121,144,155}.

En nens, s'administra sense toxicitat a dosis elevades (60 mg/kg/d) el que permet assolir de forma predicable concentracions elevades i bactericides en LCR independentment de l'ús adjuvant de dexametasona^{5,157}. En adults, les dosis tolerables són inferiors: si bé és cert que vancomicina s'ha utilitzat amb èxit en el tractament de meningitis pneumocòcica¹⁵⁸, també s'han donat casos en els que la incapacitat d'assolir i/o mantenir uns nivells terapèutics en LCR ha provocat fracàs terapèutic^{86,159}. En el model experimental, l'obtenció de nivells insuficients i el retard en l'esterilització del LCR s'evidencia encara més en presència de dexametasona^{100,108,120,144,155}. Tot plegat condueix a que vancomicina en monoteràpia sigui recomanada en nens però es consideri un tractament subòptim en adults.

3.6. COMBINACIONS ANTIBIÒTIQUES en la MENINGITIS PNEUMOCÒCICA

De les combinacions més rellevants que actualment s'accepten dins de les directrius del tractament de la meningitis pneumocòcica^{80,81}, ressaltarem l'experiència d'aquelles combinacions estudiades en aquesta tesi, quedant excloses les que incorporen cefotaxima a dosis elevades.

CEFTRIAXONA + VANCOMICINA

Una major activitat observada en corbes de letalitat (mesurada majoritàriament com efecte additiu i en alguns casos com sinergia)^{143,160} i en el model de meningitis en conill¹²¹ respecte ambdós antibiòtics en solitari, ha propiciat la seva recomanació com a tractament empíric en àrees geogràfiques on existeix una elevada prevalença de pneumococ resistent. Encara que s'ha comprovat la seva eficàcia en el LCR de nens⁸⁷, s'ha associat a fracàs terapèutic en almenys un cas de meningitis pediàtrica (CMI a penicil·lina i C3G: 2 i 0,5 µg/ml, respectivament)¹.

Davant d'una administració conjunta amb dexametasona, aquesta combinació es considera segura en nens però no en adults per l'efecte reductor que dexametasona exerceix sobre la penetració de vancomicina en LCR. En adults es recomana la combinació de ceftriaxona amb rifampicina.

CEFTRIAXONA + RIFAMPICINA

L'efecte indiferent observat en les corbes de letalitat no es correspon als resultats del model animal en el què la combinació de ceftriaxona i rifampicina va ser bactericida envers soques amb diferent sensibilitat a C3G (CMI = 1-4 µg/ml)^{100,120,161}. Aquesta bona activitat es mantenia si s'afegia dexametasona^{100,120}, considerant-se una opció terapèutica en adults en els què la combinació C3G amb vancomicina es pot veure compromesa per uns nivells insuficients de vancomicina. La manca d'estudis clínics que valorin la seva eficàcia i el risc de fracàs en limita l'aplicació.

VANCOMICINA + RIFAMPICINA

Malgrat la discordança entre l'activitat indiferent observada en corbes de letalitat i l'eficàcia mostrada en el model animal^{121,144}, alguns autors han tractat amb èxit meningitis pediàtriques en els què la monoteràpia amb cefalosporines havia fracassat^{5,11,86}. L'experiència en adults es limita a uns pocs casos clínics en el nostre hospital¹⁶². La

combinació es va mostrar efectiva en nou casos de meningitis produïda per soques sensibles a vancomicina i rifampicina, i amb diferent sensibilitat a β -lactàmics. La difusió de vancomicina a través de la BHE no es va veure modificada per l'administració de dexametasona.

Les combinacions que inclouen rifampicina podrien deixar de ser segures si es desenvolupés resistència durant el tractament¹⁶³. En els pocs treballs recollits en la literatura, no es descriu desenvolupament de resistència a rifampicina quan es combina amb ceftriaxona i/o vancomicina en la meningitis experimental causada per soques amb una CMI de fins a 4 $\mu\text{g/ml}$ ^{100,120,161,162}.

Les directrius sobre el tractament de la meningitis pneumocòcica recomanen l'addició de rifampicina únicament en casos en els què s'observa un retard en l'esterilització del LCR i sempre després d'haver comprovat que la soca sigui sensible⁸¹. Per a una valoració més fiable d'aquest supòsit són necessaris estudis experimentals i clínics que englobin casos de meningitis pneumocòcica tractats amb aquestes combinacions.

II. Hipòtesis de treball

i

Objectius

HIPÒTESIS DE TREBALL

Una de les dues soques incloses en aquesta tesi presenta un elevat grau de resistència a C3G (CMI = 16/32 µg/ml). El primer aspecte desconegut d'aquest pneumococ és si conserva la patogenicitat de les soques sensibles del mateix serotip. Els aïllaments amb serotip 23F constitueixen un percentatge important del pneumococ procedent de mostres invasives. L'ús del model de meningitis experimental ens permetrà valorar positiva o negativament el binomi adquisició de resistència = pèrdua de patogenicitat/virulència. Per aquest motiu s'utilitzaran dues soques resistents del mateix serotip però amb diferent patró de sensibilitat als β-lactàmics. El segon aspecte important és valorar les opcions terapèutiques que ens recomanen els experts i estudiar alguna combinació nova que pugui ser útil davant de l'aparició de futurs casos de meningitis deguts tant a pneumococs posseïdors d'aquests nivells de resistència com a altres pneumococs amb un patró de resistència més habitual. Les hipòtesis que s'estableixen en aquesta tesi són:

- i. L'adquisició de resistència no reduirà la virulència de les soques.
- ii. Les dues soques d'estudi podrien presentar diferències en el comportament *in vivo*, tant en la capacitat per a induir meningitis com en l'activitat inflamatòria que puguin generar en el LCR.
- iii. Les combinacions antibiòtiques millorarien l'activitat de les monoteràpies envers els dos aïllaments.
- iv. Les combinacions antibiòtiques entre dos antibiòtics no β-lactàmics podrien ser eficaces, esdevenint alternatives en el tractament de la meningitis en pacients al·lèrgics a aquesta família d'antimicrobians.
- v. La fosfomicina podria ser un bon candidat en el tractament combinat en pacients amb al·lèrgia i/o en el supòsit de fracàs amb les combinacions estàndard ja que seria actiu davant de les dues soques i presentaria una elevada penetració a través de la BHE.

Per a donar resposta a tots aquests interrogants, ens basarem en estudis *in vitro* i en l'ús de models animals. Els estudis *in vitro* valoren l'activitat antibacteriana d'un o més antibiòtics sense tenir en compte l'entorn fisiològic i/o immunològic que proporciona el model animal. El model de meningitis experimental ens permetrà una valoració més fiable de l'eficàcia dels tractaments estàndards enfront aquestes soques i comparar-los amb la fosfomicina en combinació com a alternativa terapèutica, així com l'estudi de la resposta inflamatòria induïda en cada tractament.

OBJECTIUS

1. Determinar la capacitat de generar meningitis i l'activitat inflamatòria associada d'una soca de *S. pneumoniae* amb un elevat grau de resistència a cefalosporines de tercera generació en el model experimental en conill.
2. Establir i ajustar els paràmetres farmacocinètics i farmacodinàmics en LCR dels antibiòtics que s'utilitzaran posteriorment en els estudis d'eficàcia.
3. Avaluar l'eficàcia terapèutica i la resposta inflamatòria dels tractaments empírics recomanats en la meningitis davant d'una soca de *S. pneumoniae* amb un grau més elevat de resistència a cefalosporines de tercera generació, mitjançant estudis *in vitro* i en el model experimental.
4. Estudiar l'eficàcia *in vitro* i *in vivo* i la influència en els paràmetres inflamatoris de la fosfomicina combinada com una alternativa terapèutica en el tractament de la meningitis pneumocòcica experimental produïda per dues soques amb diferent nivell de resistència a penicil·lina i a cefalosporines de tercera generació.

III. Disseny de l'estudi

Aquest treball s'ha dut a terme en el Laboratori d'Infecció Experimental del Departament de Ciències Clíniques de la Facultat de Medicina. Aquest laboratori depèn del Grup de Recerca Consolidat en Patologia Infecciosa i Sensibilitat Antibiòtica de la UB.

1. CARACTERITZACIÓ DE LES SOQUES

Les dues soques es van aïllar a partir de mostres de LCR i pertanyen al serotip 23F. Primerament es va escollir la soca amb un grau elevat de resistència a C3G pel seu patró atípic de sensibilitat a β -lactàmics. La segona soca es va seleccionar d'acord amb un patró de resistència habitual en el nostre medi i perquè ja s'havia utilitzat en altres estudis del nostre grup.

1.1. HISTÒRIA CLÍNICA

- *S. pneumoniae* **HUB 2349**: procedent del LCR d'una pacient ♀ de 62 anys d'edat amb meningitis de l'Hospital Universitari de Bellvitge (HUB), Barcelona⁴. Se li va administrar ceftriaxona 4 g/d, ajustada a una dosi de 65 mg/kg. A les 48 h de tractament, la pacient va manifestar un empitjorament amb reaparició de febre, baix nivell de consciència i altres signes associats a meningitis. Als 3 dies, el cultiu gram positiu per diplococs va confirmar el fracàs terapèutic de ceftriaxona. El tractament es va canviar a cefotaxima a dosis de 150 mg/kg/d i es va mantenir durant 10 dies en els què la pacient va millorar progressivament i es va curar sense seqüeles.
- *S. pneumoniae* **ATCC 51916 (soca CS111)**¹⁶⁴: aïllament del LCR d'una pacient ♀ de 13 mesos d'edat del *LeBonheur Children's Medical Center*, Tennessee, Estats Units¹⁰. La pacient va ingressar amb letargia i rigidesa nugal. L'anàlisi bioquímic del LCR va mostrar nivells de leucòcits (400 cèl·lules/ μ l), glucosa (2 mg/dl) i proteïnes (172 mg/dl). Els cultius de sang i LCR van ser positius per *S. pneumoniae*. Se li va administrar cefotaxima (200 mg/kg/d) i dexametasona (0,56 mg/kg/d) durant 4 dies. En el cinquè dia es va afegir vancomicina (40 mg/kg/d) iv. El cultiu de LCR no va ser estèril fins al setè dia (cefotaxima durant 7 dies més vancomicina durant 2 dies). A partir d'aquí no es va observar millora en l'estat neurològic pel què en l'onzè dia es va retirar cefotaxima i es va afegir cloramfenicol. Després de 18 dies de tractament antibiòtic i 34 dies d'ingrés, la pacient va patir greus seqüeles neurològiques irreversibles que la van obligar a ser ingressada en un centre especialitzat.

1.2. SENSIBILITAT ANTIBIÒTICA

La CMI i la CMB es van determinar pel mètode de macrodilució seguint les recomanacions del CLSI¹⁶⁵. En tots els estudis *in vitro* amb fosfomicina es va afegir una concentració final de 25 mg/l de G6P.

| soca | CMI/CMB ($\mu\text{g/ml}$) | | | | | |
|------------|------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | <i>PEN</i> | <i>CRO</i> | <i>FOS</i> | <i>RIF</i> | <i>TEI</i> | <i>VAN</i> |
| HUB 2349 | 4/4 | 2/4 | 16/64 | 0,06/0,12 | 0,03/0,25 | 0,25/0,5 |
| ATCC 51916 | 0,12/0,25 | 32/32 | 4/32 | 0,06/0,12 | 0,03/0,03 | 0,25/0,25 |

La soca HUB 2349 presenta una relació molt comú dins dels pneumococs resistents a β -lactàmics en els que la CMI a penicil·lina és superior a la CMI a C3G⁹. A més, és resistent a tetraciclines, cloramfenicol i cotrimoxazol.

La soca ATCC 51916 mostra resistència intermèdia a penicil·lina i una elevada resistència a C3G. Aquest patró és atípic dins dels aïllaments de *S. pneumoniae* i des del punt de vista genètic, és probablement el més distant del pneumococ ancestral⁹. A més, és resistent a eritromicina i cotrimoxazol.

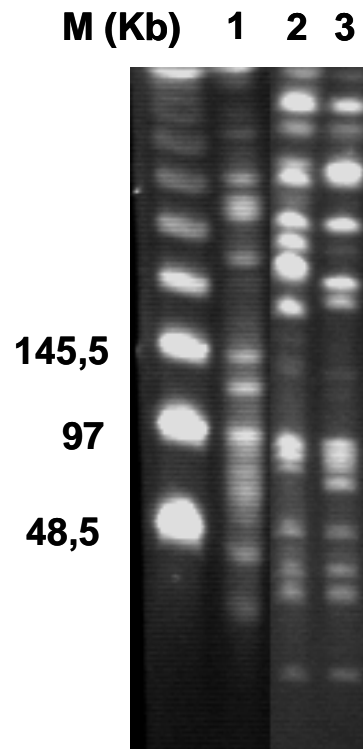
1.3. TIPIFICACIÓ MOLECULAR

La resistència a β -lactàmics de la soca *S. pneumoniae* HUB 2349 és deguda a alteracions en les PBPs 1a i 2x. En experiments de transformació genètica s'ha comprovat que les alteracions en la PBP 2x són responsables d'un canvi en la CMI a C3G (un augment de 0,03 a 0,5 $\mu\text{g/ml}$) i que les modificacions en la PBP 1a proporcionen l'adquisició de resistència (CMI = 1,5 $\mu\text{g/ml}$)¹⁶⁶.

La soca *S. pneumoniae* ATCC 51916 es caracteritza per alteracions en la PBP 1a i en la PBP 2x. Una única mutació (Thr-550→Ala) en la PBP 2x li confereix un elevat grau de resistència a C3G i seria alhora responsable de la pèrdua de resistència a penicil·lina⁴².

La tipificació molecular per PFGE¹⁶⁴ després de la restricció enzimàtica amb *SmaI* de la soca HUB 2349 va mostrar un patró de bandes compatible amb el del clon internacional Spain^{23F}-1, tot i les petites diferències en el nombre i intensitat de les bandes. Aquest resultat va ser confirmat per la tècnica del MLST²¹ en el què la soca HUB 2349 va presentar una combinació al·lèlica que va donar lloc a un ST81 que coincideix amb el de la soca ATCC del clon internacional Spain^{23F}-1. La soca ATCC 51916, soca control del clon internacional Tennessee^{23F}-4, va mostrar un perfil de PFGE i un ST diferents als de la soca HUB2349 tal i com s'indica en la figura i en la taula adjuntes.

Patrons de PFGE (*SmaI*) de:
M: Marcador de pesos moleculars.
 Línia 1: ATCC 51916, clon Tennessee^{23F}-4.
 Línia 2: ATCC 700669, clon Spain^{23F}-1.
 Línia 3: HUB 2349



| Soca | Housekeeping genes | | | | | | | ST | Clon |
|---------------------------|--------------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|----|-----------------------------|
| | <i>aroE</i> | <i>gdh</i> | <i>gki</i> | <i>recP</i> | <i>spi</i> | <i>xpt</i> | <i>ddl</i> | | |
| HUB 2349 | 4 | 4 | 2 | 4 | 4 | 1 | 1 | 81 | Spain ^{23F} -1 |
| ATCC 51916 ¹⁶⁷ | 1 | 8 | 6 | 2 | 6 | 4 | 6 | 37 | Tennessee ^{23F} -4 |

Perfil al·lèlic dels set gens metabòlics, seqüència tipus i clon al què pertany cada soca d'estudi.

2. ESTUDIS *in vitro*

2.1. CORBES DE LETALITAT

La CMI és un eina estandarditzada que ens aporta dades quantitatives sobre l'activitat antibiòtica. Però la CMI no deixa de ser un paràmetre estàtic que no reflexa les condicions reals que es trobarà l'antibiòtic en l'òrgan diana. Les corbes de letalitat donen informació sobre la dinàmica de l'activitat antimicrobiana i poden evidenciar un recreixement bacterià i/o el desenvolupament de resistència indicadors de fracàs terapèutic. En el nostre cas, per a que les condicions s'assemblassin el màxim al model animal, es van seleccionar concentracions d'antibiòtic assolibles en el LCR d'humans.

Es van preparar alíquotes de ceftriaxona, fosfomicina, rifampicina, teicoplanina i vancomicina que es van congelar i guardar a -70°C perquè cada corba es va realitzar per triplicat. En el dia de treball cada antibiòtic es va diluir a diferents concentracions (xCMI) que posteriorment es van validar amb una determinació de la CMI per microdilució amb *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ó *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 com a soques control. Es van utilitzar tubs de vidre amb 10 ml de CAMHB-5%SB en els que es va afegir l'antibiòtic (0,1 ml d'un en solitari ó 0,2 ml d'una combinació) i 0,1 ml d'un inòcul final d'entre 5×10^5 i 1×10^6 ufc/ml. Per a tenir un control del creixement, es va preparar en paral·lel un tub control al que només es va afegir l'inòcul. Els tubs es van incubar en una estufa en agitació a 37°C . A les 0, 6 i 24 h es van prendre mostres, es van cultivar directes de 0,1 ml i es van fer dilucions en SF que es van sembrar en plaques de TSA-5%SB que s'incubaren fins l'endemà.

Es va definir com a efecte bactericida una reducció de ≥ 3 log ufc/ml respecte l'inòcul inicial. Una combinació sinèrgica va ser la que va aconseguir una disminució de ≥ 2 log ufc/ml respecte l'antibiòtic en solitari més eficaç sempre i quan almenys un dels antibiòtics s'estudiés a una concentració subinhibitòria. L'efecte additiu i indiferent d'una combinació es va definir, respectivament, com la reducció d'entre 1-2 i de ± 1 log ufc/ml comparat amb l'antibiòtic sol més actiu.

2.2. ADQUISICIÓ de RESISTÈNCIA ANTIBIÒTICA

En els tubs amb antibiòtic que a les 24 h van presentar una concentració bacteriana superior a la de les 6 h, es va estudiar un possible canvi en la CMI amb l'ajuda de l'E-test.

3. MODEL ANIMAL DE MENINGITIS PNEUMOCÒCICA

El model experimental es basa en el descrit per Dacey i Sande¹¹⁵ i incorpora algunes modificacions.

Tots els protocols experimentals (Annex) han estat aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona i s'han dut a terme en l'estabulari del campus de Bellvitge.

3.1. ANIMALS

Es van utilitzar conills blancs de Nova Zelanda ♀ (per requerir una dosi menor d'anestèsia), d'entre 1,8 i 2,2 kg de pes.

Els animals van arribar a l'estabulari una setmana abans de ser utilitzats per permetre la seva adequada aclimatació i per a controlar que no desenvolupessin cap patologia. Van disposar d'aigua i pinso *ad libitum*.

3.2. ANESTÈSICS I ANALGÈSICS

Ketamina: anestèsic molt potent (durada: 20-30') amb acció analgèsica moderada.

Xilacina: relaxant muscular que proporciona una analgèsia adequada i que es combina amb ketamina per a disminuir-ne els efectes adversos.

Meloxicam: redueix la inflamació i el dolor postoperatori després de la cirurgia.

Tiopental sòdic: per la seva curta durada (5-10') s'utilitza per inducció anestèsica.

Uretà: produeix una anestèsia de llarga durada (fins a 24 h); en ser carcinogen només s'empra en experiments on l'animal no es recupera.

3.3. MODEL EXPERIMENTAL

1er Dia: CAPPING: l'animal es va anestesiar amb una mescla de ketamina (35 mg/kg) i xilacina (5 mg/kg) via im. Addicionalment se li va administrar 0,3 ml de meloxicam via sc. Amb la cara externa de les orelles i la calota cranial rasurades i desinfectades, se'l va sotmetre a una petita intervenció quirúrgica per a permetre la seva subjecció en l'aparell d'estereotàxia. Es va realitzar una incisió sobre l'eix longitudinal del crani a l'alçada de l'encreuament de les sutures sagital i coronal, es va separar el periosti i es van fer quatre forats equidistants sobre la calota cranial evitant travessar el diploe.

Tal i com s'il·lustra, es van inserir quatre cargols que fixaren una peça metàl·lica que, finalment, es va recobrir amb un "case" de ciment acrílic.

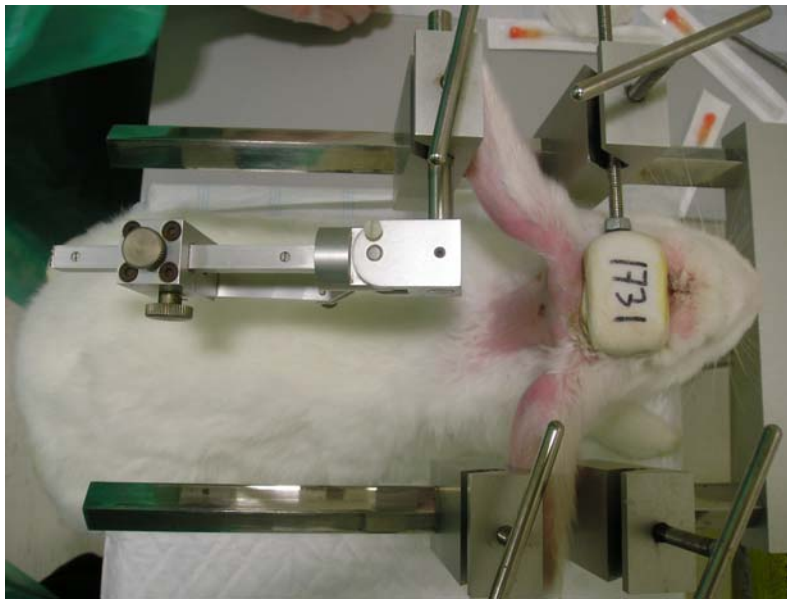


2on Dia: PREPARACIÓ del INÒCUL i INOCULACIÓ INTRACISTERNAL:

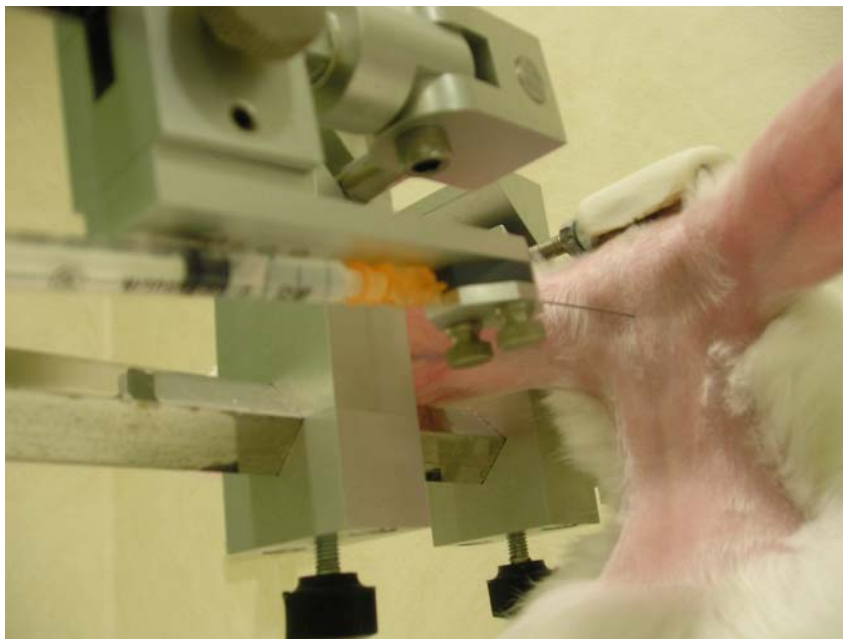
A partir d'una alíquota congelada es va fer una sembra en placa que va créixer durant tota la nit. D'aquest cultiu s'agafaren unes quantes colònies amb una nansa estèril i es van resuspendre en un parell de tubs de vidre amb 10 ml de *Brain Heart Infusion*. Els tubs es van incubar en una estufa a 37°C durant 3-4 h. Passat aquest temps, s'ompliren dos tubs de vidre amb SF i cultiu bacterià a meitats iguals i es centrifugaren a 3000 g durant 10'. Es va descartar el sobrenadant i al precipitat es va afegir SF fins obtenir una DO de 0,5 McF ($\approx 10^8$ ufc/ml). Es van fer dilucions fins a una concentració bacteriana final de $\approx 10^6$ ufc/ml, a partir de la qual es va realitzar un recompte com a control de l'inòcul amb dilucions seriades (1:10) i sembra de les dilucions: -3 (10^3 ufc/ml), -4 (10^2 ufc/ml), i -5 (10^1 ufc/ml) en plaques de TSA-5% SB que es van incubar 24 h fins la seva lectura.

Els animals es van anestesiar amb idèntica pauta que el primer dia. El conill es va col·locar en l'aparell d'estereotàxia. Es va desinfectar la zona del coll, es va palpar manualment la zona d'interès i es va introduir una agulla de punció lumbar de 25G en la cisterna magna. Es va extreure un volum de 250 μ l de LCR (*mostra PRE*: per a comprovar l'esterilitat del LCR) i es va inocular el mateix volum de la solució bacteriana amb $\approx 10^6$ ufc/ml.

El temps necessari per a obtenir uns recomptes bacterians inicials adequats per als posteriors estudis d'eficàcia ($\approx 10^4$ - 10^5 ufc/ml) va variar en funció de la soca estudiada. Per a la soca HUB 2349 va ser suficient un temps de 18-20 h postinoculació. No va ser el cas de la soca ATCC 51916 en la què va ser necessari esperar unes 40 h.



Imatges per a representar la col·locació del conill en l'aparell d'estereotàxia i la punció intracisternal per inoculació i extracció de mostres de LCR.



3er Dia: Els conills es van anestesiàr amb uretà al 20% (1,75 g/kg) via sc. Al cap d'una hora, moment en què l'anestèsia va ser efectiva, es col·locà un catèter iv. pediàtric (22G) en la vena marginal de l'orella com a via d'administració antibiòtica/SF i per si s'hagués de suplir l'anestèsia amb tiopental sòdic (5 mg/kg).

A partir d'aquí els experiments es van dividir en tres línies de treball:

a) Estudi del comportament de les soques d'estudi en absència de tractament

Es va extreure una mostra de 0,1 ml de sang de l'artèria de l'orella per a determinar bacterièmia secundària.

Es va extreure una mostra de 0,2 ml de LCR corresponent a l'hora 0. Immediatament, es va administrar 1 ml de SF via iv. per a igualar les condicions d'administració que tindrien els animals destinats a la resta d'experiments.

Es van realitzar extraccions seriades de 0,2 ml de LCR a les hores: 2, 6, 24 i 26.

A l'hora 24 es va determinar la mortalitat.

b) Estudis de farmacocinètica antibiòtica

Els experiments de farmacocinètica es van practicar en conills inoculats amb la soca *S. pneumoniae* HUB 2349. No es van repetir amb l'altra soca perquè en tractar-se del mateix microorganisme les diferències esperades respecte a la penetració antibiòtica serien mínimes i en cap cas quedaria justificada la utilització de més animals.

Les dosis seleccionades van atendre a un únic criteri: l'obtenció d'uns nivells d'antibiòtic en LCR similars als que s'observen en humans.

Es va extreure una mostra de LCR (hora 0) i immediatament es va administrar 1 ml d'un dels antimicrobians via iv. Els punts horaris d'extracció de sang (0,5 ml/punt) i LCR (0,1 ml/punt) es detallen a continuació:

| | <i>Extraccions de sang (h)</i> | <i>Extraccions de LCR (h)</i> |
|-----------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Ceftriaxona 100 mg/kg | 0'5, 1, 2, 3, 5, 8 i 24 | 1, 2, 3, 5, 8 i 24 |
| Fosfomicina 300 mg/kg | 0'5, 1, 2, 3, 5, 8 i 24 | 1, 2, 3, 5, 8 i 24 |
| Rifampicina 15 mg/kg | 0'5, 1, 2, 3, 5, 8 i 24 | 1, 2, 3, 5, 8 i 24 |
| Teicoplanina 15 mg/kg | 1, 2, 5, 8, 10, 12 i 24 | 1, 2, 5, 8, 10, 12 i 24 |
| Vancomicina 15 mg/kg | 0'5, 1, 2, 4, 6, 12 i 24 | 1, 2, 4, 6 i 12 |

c) Estudis d'eficàcia antibiòtica

Es va extreure una mostra de 0,1 ml de sang per a valorar la bacterièmia secundària.

Es va extreure una mostra de 0,2 ml de LCR a l'hora 0. Es va administrar l'antibiòtic sol o combinat via iv.

Es van realitzar extraccions seriades de 0,2 ml de LCR a les hores: 2, 6, 24 i 26.

A l'hora 24, es va determinar la mortalitat.

Les pautes antibiòtiques estudiades van ser:

- ceftriaxona 100 mg/kg/d
 - fosfomicina 300 mg/kg/6h
 - teicoplanina 15 mg/kg/d
 - vancomicina 15 mg/kg/12 h
 - ceftriaxona + vancomicina
 - fosfomicina + ceftriaxona
 - fosfomicina + vancomicina
 - fosfomicina + teicoplanina
- } en ambdues soques
- amoxicil·lina 300 mg/kg/6h
 - rifampicina 15 mg/kg/d
 - ceftriaxona + rifampicina
 - vancomicina + rifampicina
- } només en la soca *S. pneumoniae* ATCC 51916

Definicions:

Efecte Bactericida: quan es va aconseguir una reducció de ≥ 3 log ufc/ml respecte el recompte d'hora 0.

Efecte Bacteriostàtic: quan la reducció va ser de ± 1 log ufc/ml respecte l'hora 0.

Fracàs terapèutic: quan es va donar un increment d'almenys 1 log ufc/ml en la concentració bacteriana en un punt horari respecte l'anterior.

Recreixement bacterià: quan l'augment va ser de < 1 log ufc/ml vers l'hora anterior.

Desenvolupament de resistència antibiòtica: quan l'increment en la concentració bacteriana va ser degut a un canvi en la CMI comprovat amb la tècnica de l'E-test

4art Dia: al final de cada experiment els animals que sobrevisqueren van ser sacrificats amb una sobredosi de tiopental sòdic (1-2 ml) via iv.

En els estudis de comportament i eficàcia es va extreure el cervell per a determinar la presència d'edema cerebral com a paràmetre inflamatori.

3.4. PROCESSAMENT DE MOSTRES d'ESTUDIS de FARMACOCINÈTICA

Les mostres de sang es van deixar reposar 15' i a continuació es centrifugaren 10' a 10000 g. Les mostres de LCR es van centrifugar durant 5' a 10000 g. Totes les mostres es van guardar en el congelador a - 70°C fins a la posterior determinació de nivells d'antibiòtic i càlcul de paràmetres PK/PD.

3.4.1. Determinació de nivells de Teicoplanina i Vancomicina

Es va utilitzar la tècnica d'immunoassaig de polarització fluorescent. El principi d'aquesta metodologia és la unió competent entre un antigen marcat amb fluorescència (*reactiu*) i un lloc específic de la molècula d'antibiòtic (*mostra*). Aquesta unió provoca una emissió de llum polaritzada que es llegeix i es quantifica en el *TDX analyzer*.

La prèvia calibració de l'aparell i la inclusió de tres mostres control durant cada determinació van permetre validar els resultats obtinguts.

3.4.2. Determinació de nivells de Ceftriaxona, Fosfomicina i Rifampicina

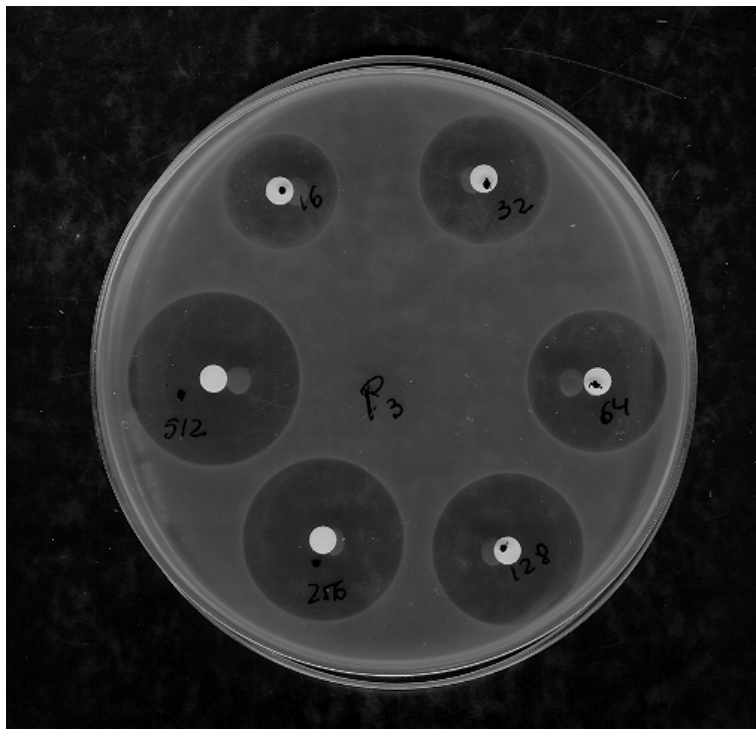
Es va utilitzar la tècnica de difusió en agar, bioassaig o mètode microbiològic que es fonamenta en l'efecte que una determinada concentració d'antibiòtic té sobre una soca ATCC de sensibilitat coneguda (*soca test*)¹⁶⁸.

Es va preparar un medi de cultiu líquid estèril, específic per aquest tipus de procediment (medi antibiòtic No.1 per a *ceftriaxona* i *rifampicina* i medi antibiòtic No.2 per a *fosfomicina*, de la casa comercial *Difco*). Es plaquejaren 17 ml d'aquest medi + 0,5 ml d'una solució amb la soca test en creixement exponencial (a una terbolesa determinada). Per a cada antibiòtic es va realitzar un banc de dilucions (1:2) amb concentracions conegudes (des de 512 µg/ml fins a 0,12 µg/ml).

| Antibiòtic | <i>Soca test</i> | <i>Terbolesa inòcul</i> | <i>Límit detecció</i> |
|-------------------|---|--------------------------------|------------------------------|
| Ceftriaxona | <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341 | 0,36 – 0,38 McF | 0,25 µg/ml |
| Fosfomicina | <i>Proteus vulgaris</i> ATCC 21100 | 0,35 – 0,46 McF | 1 µg/ml |
| Rifampicina | <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 27626 | 0,38 – 0,45 McF | 0,12 µg/ml |

En les plaques assecades, es van dispensar disquets blancs que posteriorment s'impregnaren amb mostres patró o amb mostres problema. Per a evitar la variabilitat dins de l'experiment, es va estudiar la recta patró per triplicat i les mostres per duplicat el mateix dia.

Després d'un període d'incubació específic de cada antibiòtic a 37°C, es van mesurar els halos d'inhibició que cada concentració va exercir sobre el creixement bacterià (veure imatge) i es va construir una recta de regressió (*recta patró*) a partir de la qual es van calcular els nivells en les mostres de LCR i sèrum.

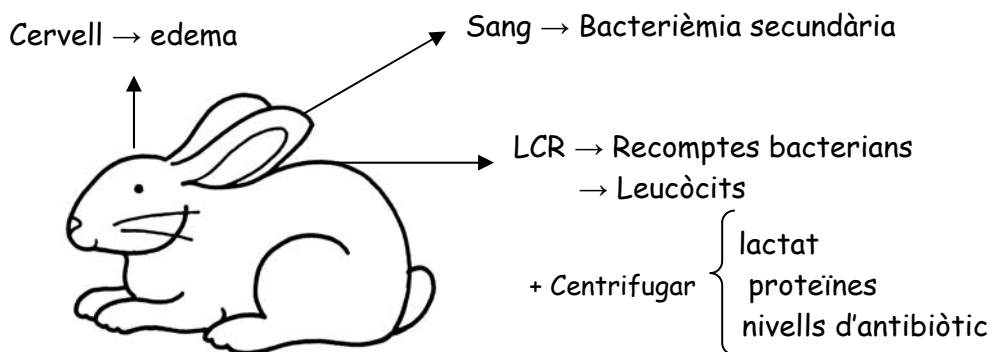


3.4.3. Càlcul dels paràmetres farmacodinàmics

Amb l'ajuda d'un programa informàtic (*PK functions for Microsoft Excel*; J. I. Usansky, A. Desai, D. Tang-Liu, *Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism*, Allergan, Irvine, CA 92606, USA) es van determinar els següents paràmetres:

- PK: vida mitjana ($T_{1/2}$), constant d'eliminació.
- PD: AUC_{0-24} , $t > CMI$, C_{max}/CMI , AUC/CMI i la penetració antibiòtica com a $(AUC_{LCR24h}/AUC_{sèrum24h})$.

3.5. PROCESSAMENT DE MOSTRES d'ESTUDIS CONTROL i d'EFICÀCIA



3.5.1. Bacterièmia secundària

El volum de sang extret de cada animal es va afegir a un tub amb 5 ml de TSB retolat amb el número del conill. Aquests tubs s'incubaren a 37°C i a les 24 h es van sembrar 0,1 ml en plaques de TSA-5%SB. Aquestes plaques s'incubaren fins l'endemà, moment en què es va determinar si hi havia o no creixement de pneumococ.

3.5.2. Recomptes bacterians

De totes les mostres de LCR es van cultivar directes de 10 µl en placa de TSA-5%SB. De les mostres obtingudes a les 0, 2, 6, 24 i 26 h es van realitzar dilucions seriades (1:10) en SF i es van sembrar 0,1 ml en plaques de TSA-5%SB.

3.5.3. Leucòcits

Es van mesclar 10 µl de LCR amb 10 µl de solució türk (àcid acètic al 10%) per a lissar els eritròcits de la mostra. Es van agafar 10 µl i es van col·locar sota un cobreobjecte en una càmera de Neubauer que és una placa quadriculada adaptada al microscopi de camp clar i que permet el recompte de cèl·lules (leucòcits/µl).

Una vegada realitzats els recomptes bacterians i de leucòcits, les mostres de LCR es van centrifugar durant 5' a 10000 g i es van guardar en el congelador a - 70°C fins a la posterior determinació de lactat i proteïnes.

3.5.4. Lactat

La concentració de lactat en LCR es va mesurar pel mètode enzimàtic *Lactate PAP* (bioMérieux SA, 69280 Marcy l'Etoile, França)¹⁶⁹ en el què la mostra problema es posa en contacte amb un reactiu enzimàtic que acaba convertint el lactat en un cromogen (quinoneïmina) que té un màxim d'absorbància a 505 nm. La lectura de l'absorbància es va fer en un espectrofotòmetre (DO: 505 nm), primer la d'un patró estàndard de concentració coneguda (3 mmol/l) i a continuació la de les mostres de LCR. Per a calcular els nivells de lactat es va aplicar la fórmula:

$$(DO_{\text{mostra}} / DO_{\text{estàndard}}) \times 3 = \dots \text{ mmol/l}$$

3.5.5. Proteïnes

Els nivells de proteïnes en LCR es va calcular pel mètode de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay*, BioRad Laboratories, München, Alemanya)¹⁷⁰ en el què un reactiu (blau brillant de Coomassie) s'uneix a la proteïna i pateix un canvi diferencial de color amb un màxim d'absorbància a 595 nm. Amb l'ajuda d'un espectrofotòmetre, primer es va llegir l'absorbància d'un patró format per quatre dilucions d'un estàndard (albúmina bovina) a diferents concentracions conegudes que ens va donar una recta de regressió. Els valors d'absorbància obtinguts de les mostres de LCR (diluïdes 1:5 en aigua destil·lada) són valors relatius que es van transformar en definitius aplicant la fórmula:

$$(DO_{\text{mostra}}) \times 5 = \dots \text{ g/l}$$

3.5.6. Edema cerebral

El cervell es va extreure obrint la calota cranial; es va pesar (pes fresc: PF), embolicar dins d'un tros de paper d'alumini (prèviament pesat) i mantenir durant una setmana en una estufa de dessecació a 100°C. Passat aquest temps, es va tornar a pesar (pes sec: PS).

El quocient $(PF_{\text{net}} - PS_{\text{net}}) / PS_{\text{net}}$ és l'edema cerebral que s'expressa com a g d'aigua per 100 g de teixit sec. Dins del model de meningitis experimental en conill, un valor ≥ 400 evidencia la presència d'edema cerebral⁹⁹.

3.5.7. Nivells antibiòtic en LCR

El protocol és el mateix que el recollit en els apartats **3.4.1.** i **3.4.2.** Els nivells d'amoxicil·lina es van mesurar per bioassaig utilitzant com a soca *test M. luteus* ATCC 9341 a una terbolesa d'entre 0,28 i 0,33 McF, amb un límit de detecció de 0,12 µg/ml.

3.6. ANÀLISI ESTADÍSTICA

Un dels pilars d'un bon disseny experimental és l'anàlisi estadística. Per a poder dur a terme aquesta anàlisi cal partir d'un tamany mostral (n) adequat. El programa informàtic PC-SIZE ens va permetre calcular la grandària de la mostra necessària per a posar de manifest l'eficàcia d'un tractament: estimant com a valors mínims necessaris una diferència de 1 log ufc/ml i una desviació estàndard de 0.8 log ufc/ml entre el grup control i el grup tractament; i establint com a variables addicionals l'error α (0,05) i la potència ($1-\beta = 0,8$). Al final es va obtenir un nombre mínim (n) = 8 conills/grup.

Així doncs, els experiments es va realitzar en grups de 4-6 conills i es van anar repetint cada setmana fins aconseguir aquesta mínima quantitat.

Una vegada es va disposar dels resultats, es van establir dos tipus de comparacions:

- Entre dues poblacions independents corresponents a les dues soques d'estudi.
- Entre els diferents grups terapèutics incloent el grup control.

El processament de les dades es va dur a terme amb el paquet estadístic SPSS 11.0.

Per a comprovar que les variables seguien una distribució normal es va aplicar el test de Kolmogorov-Smirnov.

Per a la comparació de variables que seguien una distribució normal es va utilitzar el test de la t de Student (comparació de dues variables) i l'anàlisi de variància ANOVA (més de dues variables). Un valor de $p \leq 0,05$ es va considerar estadísticament significatiu.

Per a la comparació de variables que no seguien una distribució normal es va utilitzar el test de Mann Whitney (comparació de dues variables) i el test de Kruskal-Wallis (més de dues variables). Un valor de $p \leq 0,05$ es va considerar estadísticament significatiu.

IV. Resultats

OBJECTIU 1: “Determinar la capacitat de generar meningitis i l’activitat inflamatòria associada d’una soca de *S. pneumoniae* amb un elevat grau de resistència a cefalosporines de tercera generació en el model experimental en conill”.

- 1.1.** Valoració de la capacitat de generar meningitis de la soca ATCC 51916 en el conill i establiment de la corba de creixement en animals control (sense tractament).
- 1.2.** Mesura dels paràmetres inflamatoris en el LCR de conills inoculats amb la soca ATCC 51916.
- 1.3.** Comparació de la cinètica de creixement i la inflamació produïda per dues soques del mateix serotip amb diferents patrons de resistència a β -lactàmics. Binomi Virulència - Resistència.

Ribes S, Domenech A, Cabellos C, Tubau F, Liñares J, Viladrich PF, Gudiol F. 2003. Meningitis experimental producida por una cepa de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 23F con elevada resistencia a cefalosporinas. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 21(7): 329-33.

Atesa la baixa prevalença de soques de pneumococ amb una CMI a C3G $> 4 \mu\text{g/ml}$ no es disposa d'estudis clínics ni experimentals que avaluin la seva patogenicitat. Els dos objectius principals d'aquest treball van ser l'estandardització de la cinètica de creixement de la soca ATCC 51916 per als posteriors estudis d'eficàcia i la valoració de si els mateixos canvis que proporcionen l'adquisició d'un elevat grau de resistència a C3G i una simultània pèrdua de resistència a penicil·lina en poden haver modificat la patogenicitat.

A les 18 h postinoculació, la soca ATCC 51916 va ser capaç d'induir meningitis assolint una mitjana en la concentració inicial de 3×10^3 ufc/ml que amb les hores va incrementar fins a 10^6 ufc/ml. En la comparació entre les dues soques, es va observar que la virulència en les primeres hores de la infecció (presència de bacterièmia secundària i paràmetres inflamatoris) va ser superior per la soca HUB 2349. No obstant, al final de l'experiment la soca ATCC 51916 es va mostrar més virulenta causant una major mortalitat i una resposta inflamatòria greu a l'hora 24 (amb uns paràmetres inflamatoris més elevats i un major nombre d'animals amb edema cerebral).

Les dues soques van demostrar ser patògenes en el model animal. L'adquisició de resistència no va suposar una pèrdua de virulència. Les diferències en els paràmetres inflamatoris serien independents del serotip i podrien ser causades per les variacions en les PBPs específiques de cada soca o per una major quantitat de LTA/TA alliberats.

Meningitis experimental producida por una cepa de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 23F con elevada resistencia a cefalosporinas

Sandra Ribes^a, Alejandro Doménech^a, Carmen Cabellos^b, Fe Tubau^c, Josefina Liñares^c, Pedro F. Viladrich^b y Francesc Gudiol^b

^aLaboratorio de Infección Experimental. Servicios de ^bEnfermedades Infecciosas y ^cMicrobiología. Hospital Universitario de Bellvitge. Hospitalet de Llobregat. Barcelona. España.

INTRODUCCIÓN. El aumento de cepas de *Streptococcus pneumoniae* con elevada resistencia a cefalosporinas supondría un problema en el tratamiento de las infecciones graves como la meningitis. Existen interrogantes sobre las características de estas cepas, como su capacidad para producir infecciones o la respuesta inflamatoria que generan en el líquido cefalorraquídeo.

MÉTODOS. Utilizando el modelo de meningitis neumocócica en conejo, se estudió la patogenicidad y las posibles diferencias en determinados parámetros inflamatorios de dos cepas de *S. pneumoniae* del serotipo 23F con distinta sensibilidad a betalactámicos. Las concentraciones inhibitorias mínimas fueron: cepa A (penicilina, 4 µg/ml; ceftriaxona/cefotaxima, 2 µg/ml); y cepa B (penicilina, 0,12 µg/ml; ceftriaxona/cefotaxima, 32 µg/ml).

RESULTADOS. La cepa A mostró una mayor presencia de bacteriemia secundaria y parámetros inflamatorios superiores en las primeras etapas de la infección. La cepa B produjo edema cerebral, y mayor mortalidad y actividad inflamatoria a la hora 24.

CONCLUSIONES. Ambas cepas generaron meningitis en el modelo animal. Las diferencias en la respuesta inflamatoria producida por las dos cepas podrían estar relacionadas con las variaciones que determinan el grado de resistencia a betalactámicos.

Palabras clave: *Streptococcus pneumoniae*. Resistencia antibiótica. Meningitis neumocócica experimental.

Experimental meningitis due to a high-level cephalosporin-resistant strain of *Streptococcus pneumoniae* serotype 23F

INTRODUCTION. The increasing prevalence of high-level cephalosporin-resistant strains of *Streptococcus*

pneumoniae could complicate the treatment of severe infections such as meningitis. There are still questions as to the characteristics of these strains, their ability to produce severe infection, and the inflammatory response they induce in CSF.

METHODS. Using a rabbit model of meningitis, we sought to determine the pathogenicity and differences in inflammatory parameters in two serotype 23F *S. pneumoniae* strains with different susceptibility to betalactams. Minimal inhibitory concentrations of the two strains were as follows: strain A—PEN 4 µg/mL, CRO/CTX 2 µg/mL—and strain B—PEN 0.12 µg/mL, CRO/CTX 32 µg/mL.

RESULTS. Strain A resulted in a greater incidence of secondary bacteremia and higher inflammatory parameters during the early phases of infection. Strain B caused brain edema, a more severe inflammatory response and significantly higher mortality at the end of the experiment.

CONCLUSIONS. Both strains induced meningitis in the animal model. The differences in inflammatory response produced by the two strains could be related to the variations that determine the betalactam resistance level.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*. Drug resistance. Experimental pneumococcal meningitis.

Introducción

España fue uno de los primeros países que presentó una alta prevalencia de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a penicilina y otros antibióticos¹. En la década de 1990, alrededor del 40% de los aislamientos de neumococo en líquido cefalorraquídeo (LCR) eran resistentes a penicilina, mientras que la resistencia a cefalosporinas de tercera generación se situaba entre el 3 y el 20%².

El aumento de la resistencia de *S. pneumoniae* a los betalactámicos constituye un problema terapéutico, especialmente en las enfermedades graves como la meningitis³⁻⁵. Se han documentado fracasos terapéuticos en meningitis producidas por cepas resistentes a cefalosporinas, sobre todo en aislamientos con una concentración inhibitoria mínima (CIM) mayor o igual a 2 µg/ml. Hasta el momento la práctica totalidad de casos resistentes han sido producidos por cepas con CIM igual a

Correspondencia: Dra. S. Ribes.
Laboratorio de Infección Experimental (Lab. 4131).
Hospital Universitario de Bellvitge.
Feixa Llarga, s/n. Pabellón de Gobierno (4ª planta).
08907 L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona. España.
Correo electrónico: sribes@bell.ub.es

Manuscrito recibido el 8-10-2002; aceptado el 31-12-2002.

1-2 µg/ml. Prácticamente no existe experiencia clínica ni estudios experimentales con cepas de mayor resistencia debido a su baja prevalencia, pero podrían convertirse en un problema clínico en el futuro.

Por otra parte, han surgido interrogantes sobre las características de estas cepas, como su capacidad para producir infecciones graves o la actividad inflamatoria que presentan⁶. Se ha sugerido que el serotipo influye en la gravedad de la meningitis neumocócica. La capacidad de generar una respuesta inflamatoria leve, moderada o grave, estaría relacionada con las características propias de cada serotipo para colonizar e invadir al organismo huésped^{7,8}.

El serotipo 23F presenta resistencia a penicilina y cefalosporinas con elevada frecuencia, e induce una gran respuesta inflamatoria en el LCR en el modelo animal en conejo⁶⁻⁸.

Utilizando el modelo de meningitis experimental en conejo, se ha intentado examinar la capacidad de inducir meningitis y las posibles diferencias en la respuesta inflamatoria en el LCR producidas por dos cepas de *S. pneumoniae* pertenecientes al serotipo 23F con distinta sensibilidad a betalactámicos. Se han estudiado los recuentos bacterianos y de leucocitos, la concentración de ácido láctico y proteínas en LCR, la bacteriemia secundaria a la hora 0, y la mortalidad y el edema cerebral al final del experimento.

Métodos

Cepas de estudio

Se utilizaron dos cepas de *S. pneumoniae* pertenecientes al serotipo 23F, con distinta sensibilidad a betalactámicos. Tanto la cepa A (SUB 2349) como la cepa B (ATCC 51916)^{4,9} fueron aisladas del LCR de pacientes con meningitis. Las CIM de la cepa A fueron: penicilina, 4 µg/ml; ceftriaxona/cefotaxima, 2 µg/ml; y de la cepa B: penicilina, 0,12 µg/ml; ceftriaxona/cefotaxima, 32 µg/ml.

Las suspensiones bacterianas se prepararon resuspendiendo en caldo de soja-triptona (TSB) algunas colonias de cultivos frescos de placas de agar soja-triptona (TSA) con 5% de sangre de cordero. Al cabo de 3 h de incubación, el inóculo se lavó por centrifugación, se resuspendió en suero fisiológico y se ajustó al estándar 0,5 McFarland (10⁸ unidades formadoras de colonias [UFC]/ml). Se realizaron diluciones seriadas (1:10) en suero fisiológico y se subcultivaron 100 µl de cada dilución en placas de TSA para conocer el inóculo exacto.

Pruebas de sensibilidad

La CIM se determinó mediante el método de microdilución en caldo utilizando un volumen de 100 µl, tal y como recomienda el National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS)¹⁰. Las CIM se comprobaron mediante E-test (E-test; AB Biodisks). En el método de dilución se utilizó caldo de Mueller-Hinton enriquecido con un 3-5% de sangre lisada de caballo y suplementada con cationes Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ (MH SLC CaMg) y se realizaron diluciones seriadas de antibiótico desde una concentración de 128 a 0,008 µg/ml. El inóculo final en ambos métodos fue de aproximadamente 5 × 10⁵ UFC/ml. Las concentraciones de antibiótico se comprobaron de forma paralela con las cepas control de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *S. pneumoniae* ATCC 49619. El E-test se realizó como un método de difusión en agar, utilizando placas de agar base de Mueller-Hinton con 5% de sangre de cordero, sembrando una suspensión de microorganismos de aproximadamente 10⁸ UFC/ml (0,5 McFarland). En los dos métodos, las CIM se determinaron tras 18-20 h de incubación en atmósfera con 5% de dióxido de carbono y a 35 °C. La CIM en el método de dilución en caldo se definió como la concentración

más baja de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento visible. La lectura de la CIM en el método de E-test se realizó en el punto de intersección de inhibición de crecimiento y la tira de E-test, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Modelo experimental de meningitis

Se desarrolló una modificación del protocolo descrito por Dacey y Sande¹¹, con conejos blancos de Nueva Zelanda, hembras de 2 kg de peso. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Barcelona (Campus de Bellvitge).

El tamaño de la muestra (*n*) al inicio del estudio fue de 10 conejos para cada cepa. Los animales fueron anestesiados por vía intramuscular con 3,5 mg de ketamina (Ketolar[®], Parke-Davis, El Prat de Llobregat, España) y 5 mg de xilacina (Rompun[®], Bayer AG, Leverkusen, Alemania) por kilogramo de peso corporal. Se les fijó un casco de cemento acrílico en la calota craneal para sujetarlos en un aparato de estereotaxia. La fijación del casco a este soporte metálico estereotáxico permite la extracción de LCR a lo largo del experimento.

A las 24 h, los conejos fueron anestesiados con idéntica pauta y, mediante una aguja de punción lumbar, se extrajo por vía intracisternal una muestra de 0,2 ml de LCR (muestra pre) y se les inocularon 0,2 ml de una suspensión de 10⁸ UFC/ml de la cepa de *S. pneumoniae* correspondiente. Los animales fueron anestesiados por vía subcutánea 18 h después (SC) con 1,75 mg/kg de uretano al 20% (Sigma Chemical Company, St. Louis Missouri, EE.UU.). Se extrajo una muestra de 0,1 ml de sangre de la vena marginal de la oreja del animal para hemocultivo, y una muestra de 0,2 ml de LCR (hora 0), representativa de la meningitis basal. Se obtuvieron muestras seriadas de 0,2 ml de LCR a las horas: 2, 6 y 24. Se aseguró la correcta hidratación de los animales administrando suero fisiológico por vía subcutánea a lo largo del experimento.

A la hora 24 se estudió la mortalidad. Los animales que sobrevivieron fueron sacrificados mediante una sobredosis letal de tiopental sódico (Pentotal[®] sódico, Abbott Laboratories, Madrid). A continuación se extrajeron los cerebros para la cuantificación del edema cerebral, por comparación entre el peso húmedo (inmediatamente después de la extracción) y el peso seco (tras 7 días en estufa a 100 °C). Se consideró edema cerebral a los valores superiores a 400 g de agua/100 g de peso seco¹².

Procesamiento de las muestras

A partir de la muestra pre se cultivaron 10 µl para comprobar la esterilidad del LCR al inicio del experimento.

El hemocultivo se realizó en un tubo de 5 ml de TSB y se incubó a 37 °C. A las 24 h, se cultivaron 0,1 ml en una placa de TSA para determinar la posible presencia de bacteriemia secundaria.

Con las muestras de LCR de las horas 0, 2, 6 y 24 se realizaron recuentos bacterianos por diluciones seriadas (1:10) y siembra en placas de TSA. También se realizó un recuento de leucocitos/µl mediante una cámara de Neubauer, una vez lisados los hematias con solución Türk. A continuación, las muestras se centrifugaron a 10.000 g durante 5 min y el sobrenadante se distribuyó en alícuotas que se congelaron a -80 °C. Posteriormente, se determinó la concentración de ácido láctico por el método enzimático Lactate PAP (bioMérieux SA, 69280 Marcy l'Etoile, Francia) y lectura en espectrofotómetro (505 nm)¹³. La concentración de proteínas se realizó mediante el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, BioRad Laboratories, München, Alemania) y lectura en espectrofotómetro (595 nm)¹⁴.

Análisis estadístico

Los datos se expresaron en forma de media ± desviación estándar (DE).

Para comprobar que cada variable seguía una distribución normal, se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para determinar si existían diferencias en los parámetros inflamatorios entre las dos cepas, se compararon las medias utilizando la prueba de la *t* de Student. La mortalidad, la bacteriemia secundaria y la presencia de edema cerebral se estudiaron mediante el test de Fisher. Se consideró significación estadística un valor de *p* < 0,05.

Resultados

A las 18 h postinoculación, todos los conejos del grupo de la cepa A (n = 10) y los del grupo de la cepa B (n = 9) presentaron cultivos positivos en LCR. Las curvas de crecimiento bacteriano en el tiempo para las dos cepas se representan en la figura 1. No se encontraron diferencias significativas excepto en los recuentos bacterianos (\log_{10} UFC/ml) de la hora 0 (p = 0,018).

Los valores de los parámetros inflamatorios en cada muestra horaria para las dos cepas se resumen en la tabla 1. En los conejos inoculados con la cepa A, la media de leucocitos/ μl de LCR a la hora 0 fue ligeramente inferior a la que presentaron los animales infectados con la cepa B. Los recuentos leucocitarios de las horas 2 y 6 fueron equivalentes para los dos grupos. La pleocitosis disminuyó a la hora 2 y se mantuvo estable a la hora 6. A la hora 24, el número de leucocitos en los conejos inoculados con la cepa B fue significativamente mayor (p = 0,006) al del grupo de la cepa A.

La concentración de lactato fue superior en la cepa A en las primeras horas de la infección, con diferencias significativas a la hora 6 (p = 0,002). A la hora 24, el nivel de lactato fue mayor en la cepa B.

Los niveles de proteína fueron mayores en la cepa A al inicio de la infección, estadísticamente superiores a la hora 0 (p = 0,038). A la hora 24, la concentración de proteínas fue mayor en los animales infectados con la cepa B.

La bacteriemia secundaria a la hora 0 fue mayor en la cepa A: un 80% (8/10) de los animales presentaron hemocultivo positivo frente a un 44,44% (4/9) del grupo inoculado con la cepa B. No se encontraron diferencias significativas (p = 0,13).

La mortalidad a la hora 24 fue mayor en la cepa B. Con una clara tendencia a la significación estadística (p = 0,05), el 77,8% de los conejos infectados con la cepa B murió frente a un 30% del grupo inoculado con la cepa A.

En la figura 2 se representa la dispersión de los datos de edema cerebral de cada conejo. Todos los conejos inoculados con la cepa B presentaron edema cerebral, mientras que en el grupo infectado con la cepa A sólo el 50% superó el punto de corte de 400 g de agua/100 g de peso seco que define el edema cerebral. Existe una tendencia a la significación estadística en la presencia de edema cerebral producida por las dos cepas (p = 0,05).

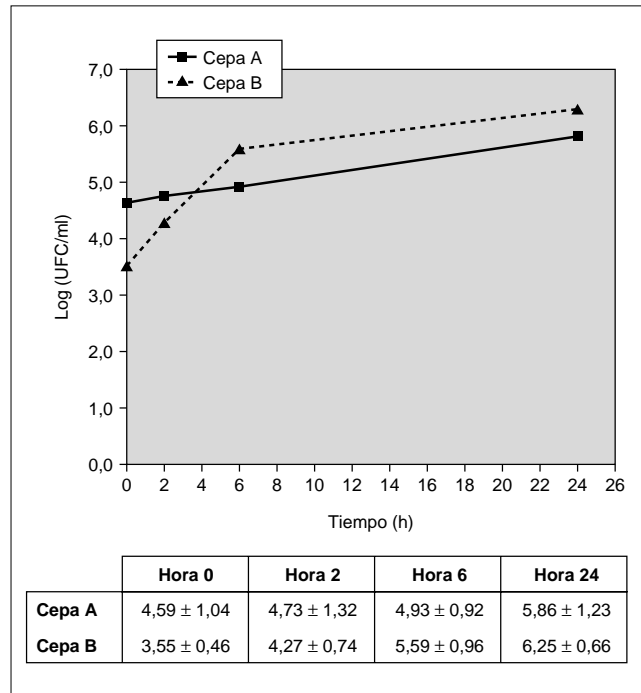


Figura 1. Recuentos bacterianos (\log_{10} UFC/ml) en el LCR de conejos en los diferentes puntos horarios, tras la inoculación de 10^6 UFC/ml de la cepa de *Streptococcus pneumoniae* 23F correspondiente. Datos en $\bar{X} \pm \text{DE}$.

CIM de la cepa A: penicilina, 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$; ceftriaxona/cefotaxima, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$; y de la cepa B: penicilina, 0,12 $\mu\text{g}/\text{ml}$; ceftriaxona/cefotaxima, 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Discusión

Este trabajo demuestra la patogenicidad de una cepa de *S. pneumoniae* 23F con elevada resistencia a cefalosporinas de 3G en el modelo de meningitis experimental. Además se ha comparado con la capacidad de inducir meningitis de una cepa de *S. pneumoniae* 23F con el patrón de resistencia que se encuentra habitualmente. En ambas cepas se ha observado la capacidad de generar una respuesta inflamatoria que se caracteriza por un aumento del número de leucocitos, de las concentraciones de lactato y proteínas, y la posible aparición de edema cerebral.

S. pneumoniae 23F es uno de los serotipos neumocócicos que presenta bacteriemia secundaria con mayor

TABLA 1. Recuento de leucocitos, concentración de ácido láctico y concentración de proteínas en el líquido cefalorraquídeo de conejos infectados con dos cepas de *Streptococcus pneumoniae* 23F

| Parámetro inflamatorio | Hora 0 | Hora 2 | Hora 6 | Hora 24 |
|-----------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| Cepa A | | | | |
| Leucocitos (cél./ μl) | 5.133 ± 3.564 (9) | 3.680 ± 2.393 (9) | 3.391 ± 1.522 (7) | 2.908 ± 1.321 (6)* |
| Ácido láctico (mmol/l) | 5,056 ± 1,213 (10) | 4,587 ± 1,115 (10) | 4,519 ± 0,840 (10)* | 7,809 ± 5,212 (7) |
| Proteínas (g/l) | 2,077 ± 1,103 (10)* | 2,229 ± 1,122 (10) | 1,981 ± 0,810 (10) | 3,384 ± 1,910 (7) |
| Cepa B | | | | |
| Leucocitos (cél./ μl) | 6.760 ± 4.197 (8) | 3.677 ± 1.337 (7) | 3.893 ± 2.023 (7) | 6.710 ± 1.949 (4) |
| Ácido láctico (mmol/l) | 4,202 ± 1,602 (9) | 3,737 ± 1,264 (7) | 3,142 ± 0,696 (8) | 11,071 ± 4,069 (4) |
| Proteínas (g/l) | 1,123 ± 0,494 (8) | 1,421 ± 0,685 (7) | 1,470 ± 0,755 (8) | 4,420 ± 2,866 (4) |

Datos en media \pm desviación estándar y número de animales (n).

* p < 0,05 entre cepas A y B.

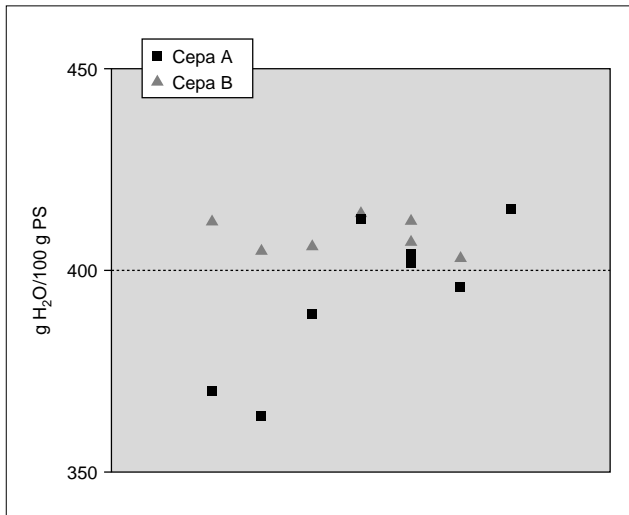


Figura 2. Dispersión de los valores de edema cerebral (g de agua/100 g de peso seco) en el cerebro de los conejos inoculados por las cepas A y B. El punto de corte que define la presencia de edema cerebral es 400 g H₂O /100 g de PS.

frecuencia¹⁵. En nuestro estudio, la aparición de bacteriemia secundaria fue mayor en la cepa A, pero no existieron diferencias significativas respecto a la cepa B.

A partir de los parámetros experimentales estudiados se observaron diferencias en la respuesta inflamatoria producida por las dos cepas de *S. pneumoniae* 23F con distinta sensibilidad a betalactámicos. En las primeras horas de la infección, el recuento de leucocitos siguió un patrón similar para las dos cepas, mientras que los niveles de lactato y proteína fueron superiores en los animales infectados con la cepa A. No obstante, a la hora 24 el número de leucocitos en los conejos inoculados con la cepa B aumentó y fue significativamente superior al de la cepa A. También la concentración de lactato y proteínas fue mayor en el grupo de la cepa B al final del experimento.

De acuerdo con la literatura médica⁸, se observó que la cepa B generó una respuesta inflamatoria grave a la hora 24: recuento de leucocitos > 5.000/ μ l; niveles de lactato > 10 mmol/l y concentración de proteínas > 2 g/l. A la hora 24, la cepa A mostró una respuesta inflamatoria moderada respecto a la pleocitosis y la concentración de lactato, pero grave si se tiene en cuenta la concentración de proteínas.

Para la cepa B, la mortalidad a la hora 24 y el edema cerebral mostraron una clara tendencia a la significación estadística, siendo ambos parámetros superiores respecto a la cepa A. De acuerdo con estos resultados, una respuesta inflamatoria grave provocaría una mayor mortalidad y la aparición de edema cerebral.

La virulencia de una cepa depende de sus características intrínsecas y de la condición del huésped al ser colonizado. En esta dura batalla se liberan una serie de productos de la pared celular que generarán una respuesta inflamatoria específica. Algunos estudios con modelos animales de infección neumocócica muestran que la sensibilidad a penicilina se asocia a una mayor virulencia^{16,17}, aunque la relación entre la adquisición de resistencia a los betalactámicos en general y la pérdida de virulencia sigue siendo un problema muy complejo.

La resistencia a betalactámicos en *S. pneumoniae* se debe a alteraciones de las proteínas fijadoras de penicilina (en inglés *penicillin-binding proteins*, PBP) que provocan una disminución de la afinidad de las PBP por estos antibióticos^{18,19}. Estudios de análisis genético de las cepas A y B permitieron hallar las PBP involucradas en la resistencia a penicilina y cefalosporinas de 3G. En la cepa A se encontraron mutaciones en la *PBP1a* y en la *PBP2x* (datos no publicados); también en la cepa B se encontraron alteraciones en *PBP1a* y *PBP2x*²⁰. Coffey et al²⁰ sugieren que una simple sustitución de Thr-550 \rightarrow Ala en la *PBP2x* sería la responsable de la resistencia de alto nivel a cefotaxima, presente en la cepa B.

Las diferencias encontradas en la actividad inflamatoria y en la virulencia de estas cepas podrían ser independientes de los epitopos determinantes de serotipo y estar relacionadas con las variaciones en la pared celular que dan los distintos grados de resistencia a betalactámicos. Cada cepa tiene unas características intrínsecas que sumadas a los factores externos procedentes del huésped, producen un comportamiento totalmente específico.

En conclusión, este trabajo muestra la capacidad de inducir meningitis de una cepa con una CIM = 32 μ g/ml para ceftriaxona/cefotaxima, y la posible existencia de diferencias en la respuesta inflamatoria inicial y en la mortalidad a la hora 24 de la meningitis producida por dos cepas de *S. pneumoniae* del mismo serotipo.

Estos hallazgos justifican la realización de estudios de eficacia antibiótica en el modelo animal para encontrar alternativas en el tratamiento de la meningitis neumocócica producida por cepas con elevada resistencia a ceftriaxona/cefotaxima.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado en parte por la beca 01/1235 procedente del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FiSss).

Sandra Ribes disfrutó de una beca procedente de la Fundació August Pi i Sunyer.

Alejandro Doménech disfrutó de una beca procedente de la Universidad de Barcelona.

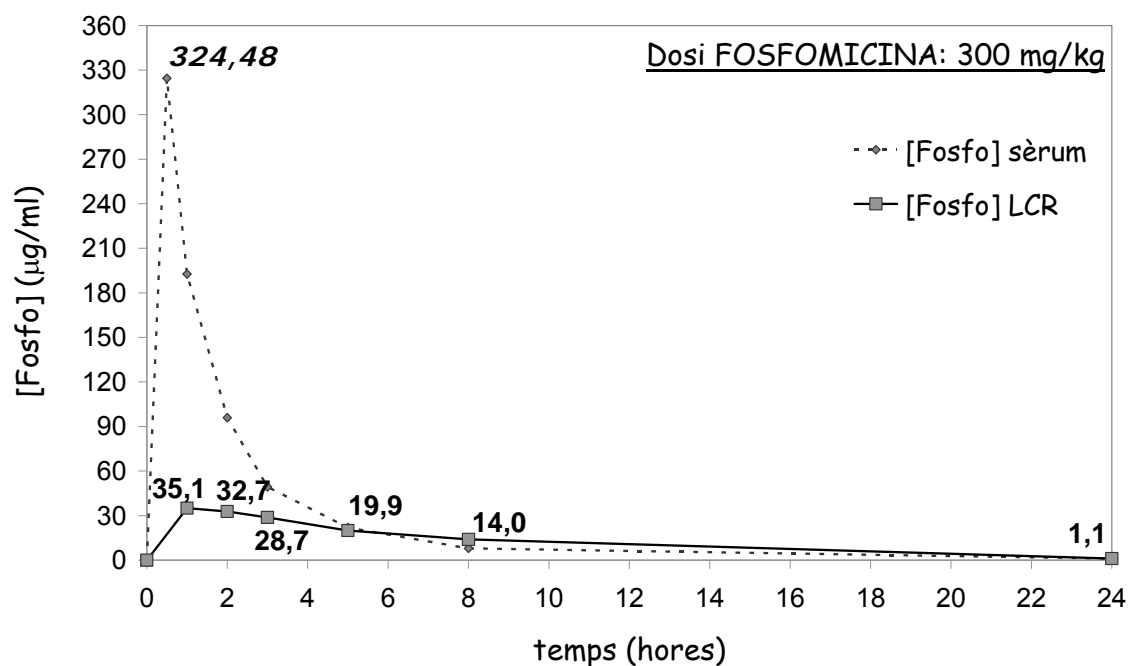
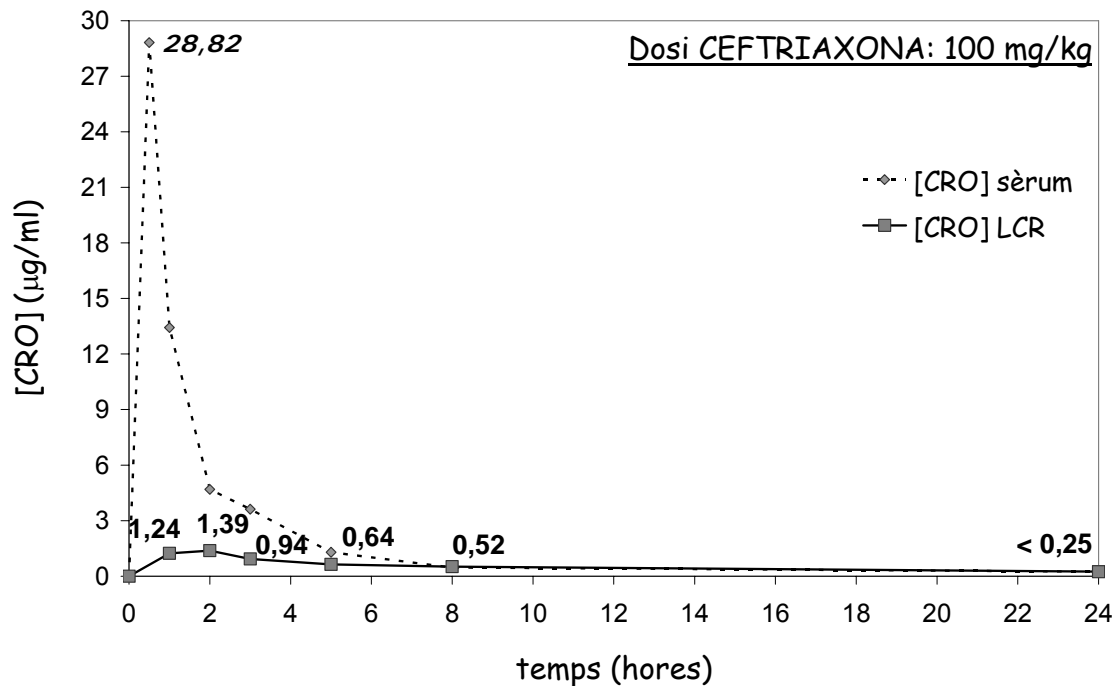
Bibliografía

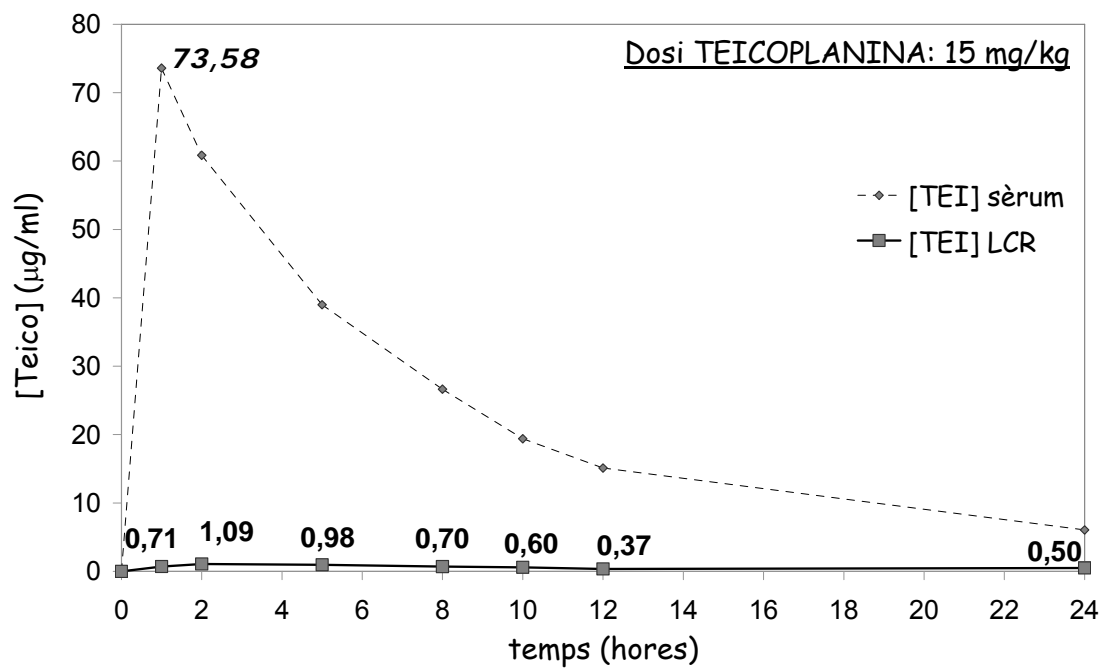
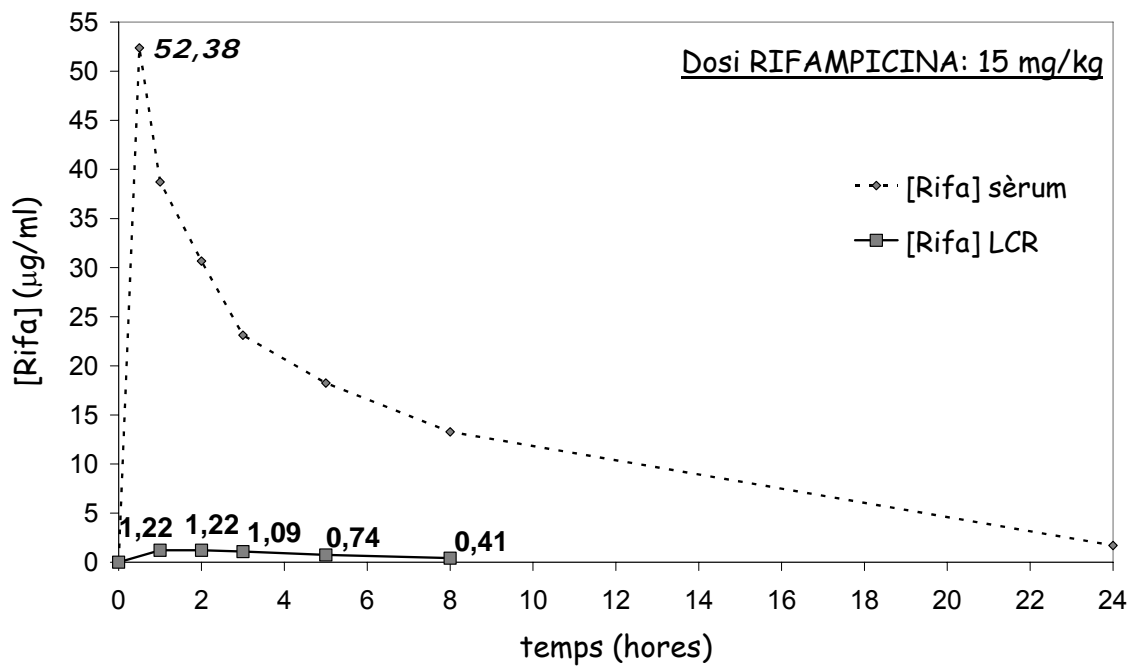
- Casal J. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*: serotype distribution of penicillin-resistant strains in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 1982;22:222-5.
- Fenoll A, Jado I, Vicioso D, Pérez A, Casal J. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antibiotic resistance in Spain: update (1990 to 1996). *J Clin Microbiol* 1998;36:3447-54.
- Viladrich PF, Gudíol F, Liñares J, Rufi G, Ariza J, Pallarés R. Characteristics and antibiotic therapy of adult meningitis due to penicillin-resistant pneumococci. *Am J Med* 1988;84:839-46.
- Sloas MM, Barreto 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* 1991;11: 662-6.
- Catalán MI, Fernández JM, Vázquez A, Varela de Seijas E, Suárez A, Bernardo de Quirós JCL. Failure of cefotaxime in the treatment of meningitis due to relatively resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 1994; 18:766-9.
- Fernández A, Cabellos C, Tubau F, Liñares J, Viladrich PF, Gudíol F. Relationship between penicillin and cephalosporin resistance of *Streptococcus pneumoniae* strains and its inflammatory activity in the experimental modelo f meningitis. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2001;190:135-8.

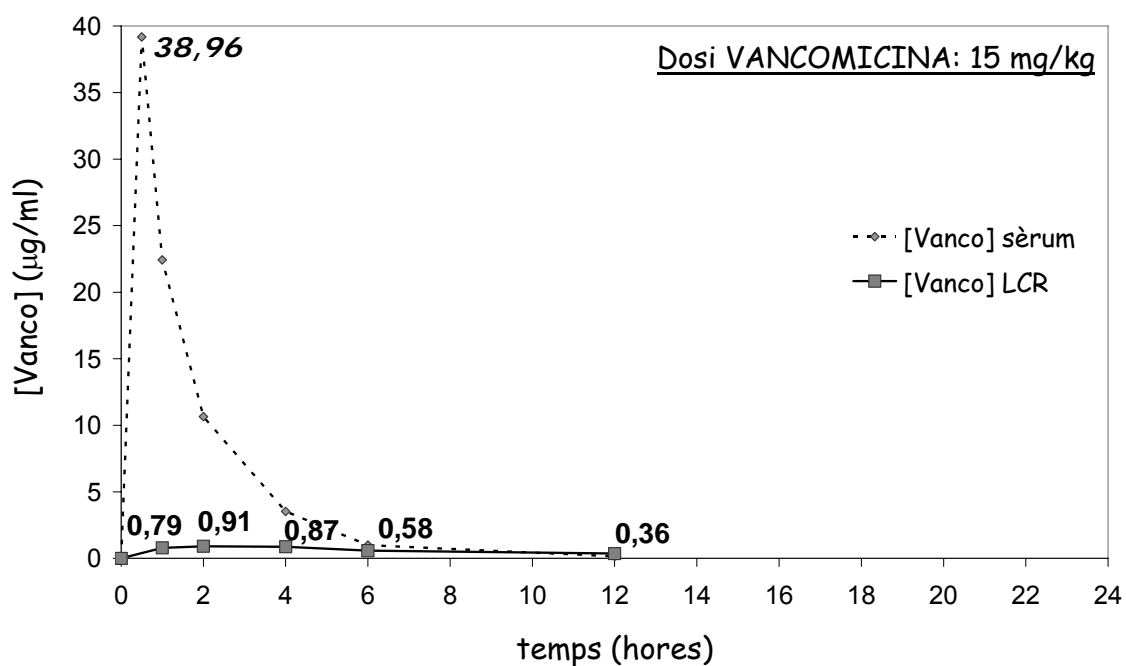
7. Tauber MG, Burroughs M, Niemoller UM, Kuster H, Borschberg U, Tuomanem E. Differences of pathophysiology in experimental meningitis caused by three strains of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 1991;163:806-11.
8. Engelhard D, Pomeranz S, Gallily R, Strauss N, Tuomanem E. Serotype-related differences in inflammatory response to *Streptococcus pneumoniae* in experimental meningitis. *J Infect Dis* 1997;175:979-82.
9. McDougal LK, Rasheed JK, Huidle JW, Tenover FC. Identification of multiple clones of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:2282-8.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard – Fifth Edition. NCCLS document M7-A5 (ISBN 1-56238-394-9). NCCLS, 2000.
11. Dacey RG, Sande MA. Effects of probenecid in cerebrospinal fluid concentration of penicillin and cephalosporin derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* 1974;6:437-41.
12. Täuber 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.
13. Shimojo N, Naka K, Nakajima C, Yoshikawa C, Okuda K, Okada K. Test-strip method for measuring lactate in whole blood. *Clin Chem* 1989;35:1992-4.
14. Duhamel RC, Meezan E, Brendel J. Determination of protein in cerebrospinal fluid, a new method. *J Biochem Biophys Methods* 1981;5:67-74.
15. Alpern ER, Alessandrini EA, McGowan KL, Bell LM, Shaw KN. Serotype prevalence of occult pneumococcal bacteremia. *Pediatrics* 2001;108:E23.
16. Azoulay-Dupuis E, Vallée B, Bédos JP, Bauchet J, Pocardalo JJ. *In vivo* efficacy of a new fluoroquinolone, sparfloxacin, against penicillin-susceptible and -resistant and multiresistant *Streptococcus pneumoniae* in a mouse model of pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:2698-703.
17. Rieux V, Carbon C, Azoulay-Dupuis E. Complex relationship between acquisition of β -lactam resistance and loss of virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 2001;184:66-72.
18. Hakenbeck R, Tarpay M, Tomasz A. Multiple change of penicillin-binding proteins in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1980;17:364-71.
19. Muñoz R, Dowson DG, 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;17:2461-5.
20. 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.

OBJECTIU 2: “Establir i ajustar els paràmetres farmacocinètics i farmacodinàmics en LCR dels antibiòtics que s'utilitzaran posteriorment en els estudis d'eficàcia”.

2.1. Determinació de la corba concentració-temps per a cada antibiòtic en el sèrum i LCR de conills inoculats amb la soca HUB 2349. En els gràfics s'inclou la concentració màxima assolida en sèrum i es detallen els nivells en LCR en cada punt horari.







2.2. Obtenció dels paràmetres PK/PD. La taula recull per ambdues soques: la $T_{1/2}$ en sèrum i en LCR i el/s paràmetre/s PD que millor es correlaciona/en amb l'eficàcia de cada antibiòtic.

| | $T_{1/2}$ (h) | | Penetració (%) | C_{max}/CMI | | AUC/CMB (h) | | t > CMI (%) Soques A i B |
|------------|---------------|-------|----------------|---------------|--------|-------------|--------|-----------------------------|
| | srm | LCR | | Soca A | Soca B | Soca A | Soca B | |
| CRO | 1,35 | 4,85 | 28,4 | | | | | 0 |
| FOS | 3,08 | 4,54 | 49,2 | 2,19 | 8,78 | | | > 100 |
| RIF | 5,10 | 8,58 | 3,8 | 20 | | 95,3 | | 100 |
| TEI | 6,37 | 12,01 | 2,3 | 33,3 | | | | > 100 |
| VAN | 1,48 | 8,32 | 14,6 | | | 18,91 | 37,82 | > 100 |

CRO: Ceftriaxona; FOS: Fosfomicina; RIF: Rifampicina; TEI: Teicoplanina; VAN: Vancomicina

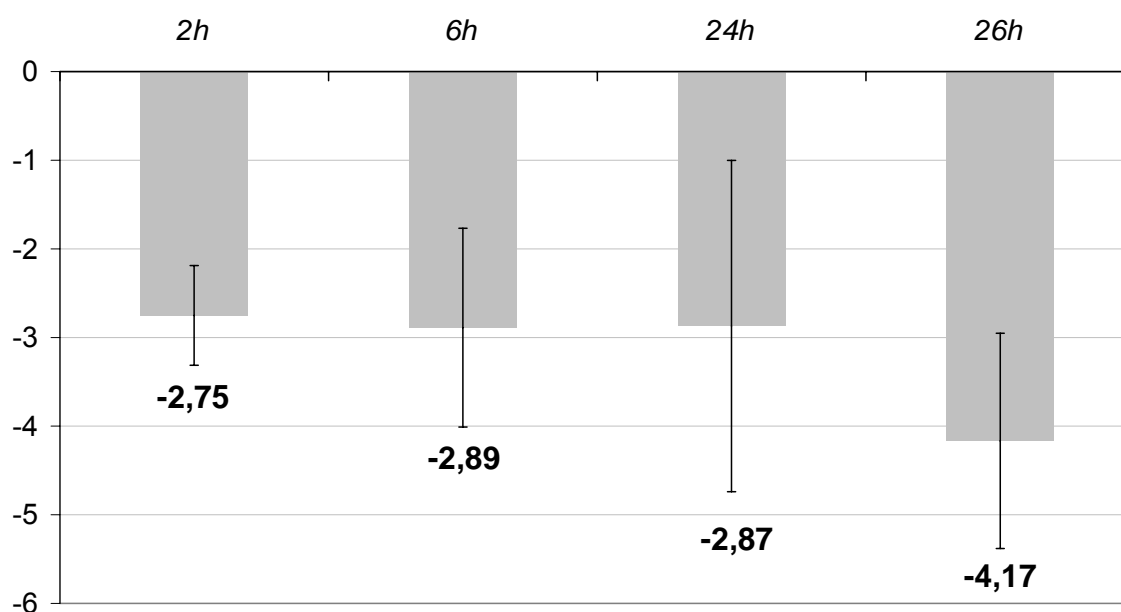
Soca A: HUB 2349; soca B: Soca ATCC 51916

OBJECTIU 3: “Avaluar l’eficàcia terapèutica i la resposta inflamatòria dels tractaments empírics recomanats en la meningitis davant d’una soca de *S. pneumoniae* amb un grau elevat de resistència a cefalosporines de tercera generació, mitjançant estudis *in vitro* i en el model experimental”.

- 3.1.** Estudi de l’activitat d’amoxicil·lina sola en conills inoculats amb la soca ATCC 51916.
- 3.2.** Estudi de l’activitat *in vitro* / *in vivo* de ceftriaxona, rifampicina i vancomicina en monoteràpia davant de la soca ATCC 51916.
- 3.3.** Estudi de l’eficàcia *in vitro* / *in vivo* de ceftriaxona + rifampicina, ceftriaxona + vancomicina i vancomicina + rifampicina envers la soca ATCC 51916
- 3.4.** Determinació de la resposta inflamatòria en el LCR dels conills induïda per cadascuna de les pautes antibiòtiques recollides en els dos punts anteriors.

Objectiu 3.1. Malgrat que en el nostre país no es comercialitza amoxicil·lina iv., l'estudi de la seva activitat davant de la soca ATCC 51916 queda justificat per la CMI de 0,12 µg/ml que presenta.

En el model experimental, l'administració d'amoxicil·lina 300 mg/kg/6h va produir recreixement bacterià en 4/8 conills a l'hora 6 i en un més a l'hora 24. Tot i que en la gràfica la disminució de la concentració bacteriana en les hores 6 i 24 s'aproxima a l'efecte bactericida, la representació de la desviació estàndard fa notar una elevada dispersió en els resultats obtinguts. Al final de l'experiment només 3/8 conills van presentar LCR estèril.



Descens de log ufc/ml en el LCR de conills tractats amb Amoxicil·lina 300 mg/kg/6h

La determinació dels nivells d'amoxicil·lina en el LCR d'aquests conills mostra un perfil farmacodinàmic favorable (concentracions pic de $2,80 \pm 1,44$ µg/ml [hora 2] i $2,52 \pm 1,47$ µg/ml [hora 26]; concentracions vall de $1,25 \pm 1,11$ µg/ml [hora 6] i $0,51 \pm 0,12$ µg/ml [hora 24]) de manera que l'antibiòtic va estar per sobre la CMI del pneumococ durant un temps superior al 100% de l'interval de dosificació en tots els conills.

No es va estudiar un possible canvi en la CMI del pneumococ durant el tractament, però aquest fet resulta improbable perquè encara que es va observar recreixement en alguns conills, les posteriors administracions d'amoxicil·lina van aconseguir disminuir la concentració bacteriana en les successives mostres de LCR d'aquests animals.

Objectius 3.2. - 3.3.

Ribes S, Taberner F, Domenech A, Cabellos C, Tubau F, Liñares J, Viladrich PF, Gudiol F. 2005. Evaluation of ceftriaxone, vancomycin and rifampicin alone and combined in an experimental model of meningitis caused by highly cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* ATCC 51916. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 56(5): 979-82.

Una vegada estandarditzat el creixement d'aquesta soca en animals control, el següent pas va ser l'anàlisi de l'eficàcia dels tractaments recomanats. Ceftriaxona i vancomicina van produir fracassos terapèutics en el conill d'acord amb els paràmetres farmacodinàmics assolits. Rifampicina va ser bactericida en el conill però en monoteràpia està desaconsellada pel possible desenvolupament de resistència tal i com va succeir *in vitro*.

L'efecte additiu observat en les corbes de letalitat de ceftriaxona més vancomicina es va correlacionar amb l'augment de l'activitat *in vivo* envers els dos antibiòtics en solitari però en cap cas la combinació es va mostrar sinèrgica. Es va observar discordança entre els resultats *in vitro* i *in vivo* en l'estudi de les combinacions que inclouen rifampicina. L'efecte indiferent exhibit en les corbes de letalitat no va concordar amb l'activitat bactericida mostrada en el model animal. D'altra banda, l'aparició de mutants resistents a rifampicina que es va donar *in vitro* no es va veure recolzada en el model animal. En cap conill i en cap punt horari es va observar fracàs o recreixement bacterià que pogués indicar el contrari.

Rifampicina va produir una menor resposta inflamatòria que la resta de monoteràpies. Com a contrapunt, ceftriaxona va generar la resposta inflamatòria més greu, similar a la dels animals control. L'addició de rifampicina o vancomicina a ceftriaxona va atenuar la inflamació.

Evaluation of ceftriaxone, vancomycin and rifampicin alone and combined in an experimental model of meningitis caused by highly cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* ATCC 51916

Sandra Ribes^{1*}, Ferran Taberner¹, Alejandro Domenech¹, Carmen Cabellos¹, Fe Tubau²,
Josefina Liñares², Pedro Fernández Viladrich¹ and Francesc Gudiol¹

¹Laboratory of Experimental Infection, Infectious Diseases Department and ²Microbiology Department, IDIBELL—Hospital Universitari de Bellvitge—Universitat de Barcelona, L'Hospitalet, Barcelona, Spain

Received 25 April 2005; returned 16 June 2005; revised 29 June 2005; accepted 15 August 2005

Objectives: The aim of the study was to assess the *in vitro* and *in vivo* efficacy of ceftriaxone, vancomycin and rifampicin alone and combined against *Streptococcus pneumoniae* ATCC 51916 (MIC of ceftriaxone: 32 mg/L).

Methods: *In vitro* killing curves were performed with clinically achievable CSF antibiotic concentrations. In the rabbit model of pneumococcal meningitis, we studied the efficacy of and effects on inflammation of treatment with ceftriaxone 100 mg/kg/day, vancomycin 30 mg/kg/day and rifampicin 15 mg/kg/day, alone and combined, over a 26 h period.

Results: Time–kill curves showed that vancomycin was bactericidal, and ceftriaxone and rifampicin produced a bacteriostatic effect. An additive effect was observed when combinations of ceftriaxone plus vancomycin were studied at subinhibitory concentrations. Emergence of resistance to rifampicin was detected both when rifampicin was studied alone and when combined with ceftriaxone or vancomycin. In the rabbit meningitis model, ceftriaxone was bacteriostatic, whereas rifampicin and vancomycin were bactericidal at 24 h. Although not synergistic, the combinations of ceftriaxone plus vancomycin or rifampicin, and vancomycin plus rifampicin, improved the efficacy of any antibiotic tested alone—all combinations were bactericidal from 6 h—and significantly decreased inflammatory parameters in CSF compared with control and ceftriaxone groups.

Conclusion: Ceftriaxone plus vancomycin, and vancomycin plus rifampicin appeared to be effective in the therapy of experimental pneumococcal meningitis caused by highly cephalosporin-resistant strains such as ATCC 51916. Our results provide an experimental basis for using these combinations as empirical therapy for pneumococcal meningitis, regardless of the degree of cephalosporin resistance of the causative strain.

Keywords: β -lactams, glycopeptides, empirical therapy, bacterial meningitis

Introduction

The combination of ceftriaxone or cefotaxime with vancomycin is recommended by most experts for pneumococcal meningitis caused by resistant strains.¹ This recommendation has proven useful in the clinical setting, where ceftriaxone/cefotaxime MICs of resistant strains rarely exceed 4 mg/L. However, there are no studies that support this approach in meningitis caused by pneumococcal strains with a very high level of cephalosporin resistance.

Strains of this kind have occasionally been identified in the USA and in Spain.^{2–4} One of them, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 51916 (Tennessee^{23F}-4 clone, CS111 strain) caused otitis media and meningitis in a child who failed to respond to cefotaxime therapy.³ This strain is characterized by a high level of resistance to ceftriaxone/cefotaxime (MICs of 32 mg/L) and intermediate resistance to penicillin.² Recently, our group reported the capacity of this strain to promote meningitis with a strong inflammatory response in rabbits.⁵

*Correspondence address. Infectious Diseases Service, Hospital Universitari de Bellvitge, Feixa Llargà s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. Tel: +34-932607625/34-934035805; Fax: +34-932607637; E-mail: sribes@ub.edu

The aim of this study was to assess the *in vitro* and *in vivo* efficacy of and the effects on inflammation of treatment with ceftriaxone, vancomycin and rifampicin, alone and combined, against *S. pneumoniae* ATCC 51916.

Materials and methods

Susceptibility tests

MIC/MBCs of ceftriaxone, rifampicin and vancomycin for *S. pneumoniae* ATCC 51916 were determined by the macrodilution method according to the NCCLS.⁶

In vitro killing curves

Time-kill studies were performed with antibiotic concentrations achievable in CSF. Ceftriaxone (Laboratorios Farmacéuticos Rovi, S.A., Madrid, Spain) was studied at 1/16 and 1/8 × MIC. Rifampicin (Aventis, Madrid, Spain) and vancomycin (Laboratorios Normon S.A., Madrid, Spain) were studied in a range from 1/4–4 × MIC. The antibiotic concentrations used in combinations were 1/16–1/8 × MIC for ceftriaxone and 1/4–1 × MIC for rifampicin and vancomycin. Bactericidal effect was defined as a decrease of ≥3 log cfu/mL. Synergy was defined as a >2 log cfu/mL decrease over the most active agent alone with one of the drugs at subinhibitory concentration. Additive and indifferent effects were, respectively, defined as a reduction of between 1–2 log cfu/mL and of ±1 log cfu/mL compared with the most active single antibiotic.⁷ Emergence of resistance was studied at 24 h using the Etest method.

Meningitis model

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Experiments at the University of Barcelona. The animal model originally described by Dacey and Sande⁸ was slightly modified. Young female New Zealand White rabbits were anaesthetized intramuscularly with 35 mg/kg of ketamine (Ketolar; Parke-Davis, Prat de Llobregat, Spain) and 5 mg/kg of xylazine (Rompun; Bayer AG, Leverkusen, Germany). Meningitis was induced by intracisternal injection of 250 µL of 10⁶ cfu/mL of the ATCC 51916 strain. Owing to the slow progression of disease with this strain⁵, we modified the usual time between inoculation and start of therapy. Approx. 40 h after inoculation, the rabbits were anaesthetized with urethane (Sigma Chemical Company, St Louis, USA) at 1.75 g/kg subcutaneously and thiopental sodium (Tiopental; Braun Medical S.A., Rubí, Spain) at 5 mg/kg intravenously (iv). A blood sample was collected to assess secondary bacteraemia. A baseline CSF sample (0 h) was taken and iv therapy ($n \geq 8$ rabbits/group) was given for 26 h. Ceftriaxone 100 mg/kg and rifampicin 15 mg/kg were injected once daily. Vancomycin 15 mg/kg was administered every 12 h. Combined regimens were: ceftriaxone plus rifampicin, ceftriaxone plus vancomycin and rifampicin plus vancomycin. Untreated controls ($n = 12$) received saline (Suero Fisiológico Braun, Braun S.A., Barcelona, Spain). CSF samples were taken at 2 (peak), 6, 24 (trough) and 26 h (peak) of treatment, and were used to determine bacterial and white blood cell (WBC) counts, and lactate, protein and antibiotic concentrations. Animals were euthanized with thiopental sodium at the end of each experiment, or earlier if they were severely lethargic or not recoverable.

Bacterial counts were determined by plating 10-fold dilutions and an undiluted 0.1 mL CSF sample on blood agar plates. The detection limit was 10 cfu/mL. For purposes of analysis, a value of 0.99 log cfu/mL was assigned to the first sterile culture, and a value of 0 log cfu/mL to the subsequent ones. Therapeutic failure was defined as an increase in bacterial concentration of at least 1 log cfu/mL compared with a

previous count. Bactericidal effect was defined as a reduction of ≥3 log cfu/mL.

Ceftriaxone and rifampicin concentrations were determined by the agar disc diffusion method using as assay organisms *Bacillus subtilis* ATCC 12432 and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 27626, respectively. Vancomycin levels were measured by fluorescence polarization immunoassay.

Statistical analysis

ANOVA test (followed by Scheffe's test) or Kruskal–Wallis test (inflammatory activity) were used. A *P* value of <0.05 was considered significant.

Results

In vitro studies

MIC/MBCs (mg/L) were: ceftriaxone 32/32, rifampicin 0.06/0.12, and vancomycin 0.25/0.25.

In killing curves, vancomycin had a bactericidal effect at 6 h (mean Δ log cfu/mL \pm SD: -3.27 ± 1.30 at 1 × MIC, and -3.69 ± 1.42 at 4 × MIC). Rifampicin at 4 × MIC reached a bacteriostatic effect with a mean decrease of -0.847 ± 0.257 log cfu/mL. Neither vancomycin and rifampicin at lower concentrations nor ceftriaxone at 1/8 × MIC and 1/16 × MIC showed growth inhibition. An additive effect was found when vancomycin at 1/2 × MIC was combined with ceftriaxone at 1/8 × MIC or at 1/16 × MIC. Rifampicin combinations showed an indifferent effect. Emergence of resistance was detected when rifampicin was studied alone and combined.

In vivo experiments

Secondary bacteraemia among different groups ranged from 62.5 to 100%. Mortality at 24 h was 58.3% in the untreated group and 0% in all therapies. CSF bacterial counts at 0 h and CSF bacterial decreases for different schedules are summarized in Table 1. Mean CSF peak and trough antibiotic levels of rabbits are shown in Table 2.

Ceftriaxone monotherapy produced a bacteriostatic effect. Therapeutic failure at 24 h occurred in 3/8 animals.

Rifampicin alone was bactericidal at 24 h ($P = 0.001$ compared with ceftriaxone). CSF bacterial counts were below the limit of detection in all rabbits except one that showed a slightly lower bacterial reduction (-2.99 log cfu/mL at 24 h; -3.19 log cfu/mL at 26 h) that was associated with low CSF rifampicin levels (0.227 mg/L).

The activity of vancomycin was similar to that of rifampicin at 6 h, and was bactericidal at 24 h ($P = 0.033$ compared with ceftriaxone). Regrowth occurred in one rabbit at 24 h, which presented CSF levels of 0.03 and 0.53 mg/L at 24 and 26 h, respectively.

All combinations achieved a bactericidal effect at 6 h. There was no regrowth and bacterial concentrations at 26 h were below the limit of detection. Ceftriaxone combined with rifampicin or vancomycin improved the activity of both drugs alone and the effects were statistically significant compared with ceftriaxone monotherapy ($P < 0.03$). Rifampicin plus vancomycin did not produce significant variations in the activity of either drug alone, but was more effective than ceftriaxone ($P < 0.01$).

Control and ceftriaxone groups produced a high inflammatory response characterized by statistically significant increased values of lactate ($P = 0.000$ compared with all therapies). Ceftriaxone

Therapy of highly resistant pneumococcal meningitis

Table 1. CSF bacterial counts at 0 h and bacterial killing rates at 6, 24 and 26 h after antimicrobial therapy in experimental pneumococcal meningitis caused by the highly cephalosporin-resistant ATCC 51916 strain

| Therapy and dosage (n) ^a | Initial titres (log cfu/mL) | Changes in bacterial counts (Δ log cfu/mL) at | | |
|-------------------------------------|--------------------------------|---|-------------------|-------------------|
| | | 6 h | 24 h | 26 h |
| CRO 100 mg/kg/day (8) | 5.23 \pm 0.88 | -0.76 \pm 1.70 | -0.75 \pm 1.72 | -1.01 \pm 1.78 |
| RIF 15 mg/kg/day (8) | 5.45 \pm 0.76 | -2.42 \pm 0.49 | -4.25 \pm 0.91* | -5.14 \pm 1.09* |
| VAN 15 mg/kg/12 h (8) | 5.00 \pm 0.76 | -2.71 \pm 1.80 | -3.44 \pm 1.47* | -4.26 \pm 1.48* |
| CRO 100 + RIF 15 (10) | 5.10 \pm 0.80 | -3.24 \pm 0.75* | -4.31 \pm 0.84* | -5.10 \pm 0.80* |
| CRO 100 + VAN 15 (8) | 5.17 \pm 1.14 | -3.90 \pm 1.47* | -4.25 \pm 1.17* | -5.05 \pm 1.30* |
| RIF 15 + VAN 15 (8) | 5.18 \pm 1.05 | -3.56 \pm 1.36* | -4.31 \pm 1.19* | -5.18 \pm 1.05* |
| Control (12) | 4.78 \pm 0.84 | 1.11 \pm 0.87 | 1.12 \pm 2.09 | 1.07 \pm 2.32 |

Data are expressed as means \pm SD.

^an, number of animals; CRO, ceftriaxone; RIF, rifampicin; VAN, vancomycin.

* $P < 0.04$ versus CRO group (ANOVA test).

Table 2. Mean CSF antibiotic levels (mg/L; \pm SD) at 2, 24 and 26 h after antimicrobial therapy in experimental pneumococcal meningitis caused by the highly cephalosporin-resistant ATCC 51916 strain

| Therapy ^a | Peak 2 h | Trough 24 h | Peak 26 h |
|----------------------|-----------------|------------------------------|-----------------|
| CRO 100 mg/kg/day | 4.61 \pm 2.74 | 0.30 \pm 0.02 ^b | 4.84 \pm 3.06 |
| RIF 15 mg/kg/day | 0.81 \pm 0.32 | 0.22 \pm 0.15 ^b | 0.75 \pm 0.41 |
| VAN 15 mg/kg/12 h | 1.01 \pm 0.59 | 0.39 \pm 0.25 | 1.44 \pm 1.27 |

^aCRO, ceftriaxone; RIF, rifampicin; VAN, vancomycin.

^bMeasurement of trough concentrations at 24 h was only possible in 2/8 rabbits.

monotherapy produced increased WBC counts at 26 h in comparison with the other groups ($P = 0.002$). At 26 h, rifampicin, rifampicin plus vancomycin, and ceftriaxone plus vancomycin produced a lower protein content compared with untreated animals ($P \leq 0.03$).

Discussion

The virulence of the ATCC 51916 strain in the rabbit meningitis model has been demonstrated previously⁵ and was confirmed in the present experiment by the findings in control animals, in which a high inflammatory response combined with a high bacterial concentration in CSF led to a mortality rate of 58.3% at 24 h.

In view of the high cephalosporin resistance of the ATCC 51916 strain, we expected ceftriaxone monotherapy to be totally ineffective. However, although ceftriaxone peak levels were negligible compared with the MBC, therapeutic failures occurred in only 37.5% of the rabbits and a bacteriostatic effect was seen in the rest. If we consider that animals were sacrificed at 26 h, the low rate of ceftriaxone-associated therapeutic failures should be attributed to the short duration of the experiment.

Vancomycin was an effective therapy against this pneumococcal strain. However, its erratic penetration across the blood-brain barrier was confirmed in our model, where therapeutic failure occurred once CSF levels declined.

Friedland *et al.*⁹ demonstrated that ceftriaxone plus vancomycin was synergistic against both cephalosporin-intermediately

susceptible and -resistant pneumococci. However, we did not observe synergy either *in vitro* or in the animal model as reported by other investigators.^{10,11} In our *in vitro* studies, vancomycin plus ceftriaxone at concentrations achievable in CSF had an additive effect. These results had a good correlation with *in vivo* experiments, where this combination was effective against the ATCC 51916 strain ($P \leq 0.002$ compared with ceftriaxone, no differences compared with vancomycin).

It is well known that dexamethasone may decrease the penetration of vancomycin into the subarachnoid space. The effect of adjunctive dexamethasone on the efficacy of ceftriaxone plus vancomycin against this highly resistant strain should be evaluated in further studies.

Our *in vitro* data confirmed previous findings of an indifferent effect when rifampicin was added to ceftriaxone or vancomycin.^{11,12} However, in the animal model, although not statistically superior, rifampicin combinations improved the activity of rifampicin alone; and rifampicin plus ceftriaxone showed better *in vivo* activity than ceftriaxone alone. This discordance between *in vitro* and *in vivo* results has been previously reported.¹² Emergence of resistance did not occur in the animal model when rifampicin was tested either in monotherapy or in combination, although it was detected in time-kill curves. Single use of rifampicin may not be warranted in clinical practice owing to the rapid emergence of resistance. The possibility of development of resistance during combined therapy is a matter of concern; although rare, it may be more likely in the case of low activity of the associated drug, as occurs in the combination of ceftriaxone plus rifampicin against the ATCC 51916 strain. This fact may limit the use of this combination in the clinical setting.

In the initial phase of treatment with a bactericidal antibiotic such as ceftriaxone, we would expect a burst of meningeal inflammation as a consequence of rapid bacterial lysis. However, possibly due to its low activity against this highly resistant strain, the inflammatory response induced by ceftriaxone was similar to that observed in control animals. Inflammatory data obtained in our experiments with rifampicin confirm its low potential for inducing a CSF inflammatory response, and that the addition of rifampicin or vancomycin to ceftriaxone led to a reduction in inflammatory parameters compared with ceftriaxone monotherapy.

In conclusion, ceftriaxone plus vancomycin, and vancomycin plus rifampicin appeared to be effective and appropriate

combinations in treating experimental pneumococcal meningitis caused by highly cephalosporin-resistant strains. Our results provide an experimental basis for using these antibiotic combinations for empirical therapy of pneumococcal meningitis, regardless of the degree of cephalosporin resistance of the causative strain.

Acknowledgements

This study was supported by a grant FIS 01/1235. S. Ribes, F. Taberner and A. Domenech were supported by grants from IDIBELL and Universitat de Barcelona.

References

1. Kaplan SL, Mason EO Jr. Management of infections due to antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Rev* 1998; **11**: 628–44.
2. McDougal LK, Rasheed JK, Biddle JW *et al.* Identification of multiple clones of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**: 2282–8.
3. Sloas MM, Barrett FF, Chesney PJ *et al.* Cephalosporin treatment failure in penicillin- and cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 1992; **11**: 662–6.
4. Ruiz J, Sempere M, Simarro E *et al.* Description of two new isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Spain that are highly resistant to cefotaxime. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**: 2768–9.
5. Ribes S, Domenech A, Cabellos C *et al.* Meningitis experimental producida por una cepa de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 23F con elevada resistencia a cefalosporinas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; **1**: 329–33.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically—Fifth Edition: Approved Standard M7-A5*. NCCLS, Villanova, PA, USA, 2000.
7. Eliopoulos GM, Moellering RC Jr. Antimicrobial combinations. In: Lorian V, ed. *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4th edn. Baltimore: The Williams & Wilkins Co., 1996; 330–96.
8. Dacey RG, Sande MA. Effect of probenecid on cerebrospinal fluid concentrations of penicillin and cephalosporin derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* 1974; **6**: 437–41.
9. Friedland IR, Paris M, Ehrett S *et al.* Evaluation of antimicrobial regimens for treatment of experimental penicillin- and cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; **37**: 1630–6.
10. Kim BN, Woo JH, Kim YS *et al.* Time–kill studies of antimicrobial combinations including cefotaxime, ceftriaxone, vancomycin and meropenem against cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Chemotherapy* 2000; **46**: 303–8.
11. Doit C, Bonacorsi SP, Fremaux AJ *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.
12. Tubau F, Cabellos C, Liñares J. Lack of correlation between *in vitro* and *in vivo* studies of combinations of rifampin plus vancomycin or β -lactam antibiotics against *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; **40**: 1573–4.

Objectiu 3.4. Els valors dels paràmetres inflamatoris en el LCR de conills infectats amb la soca ATCC 51916 per a tots els tractaments es resumeixen en una taula ja que en l'article es van comentar molt breument. Les dades es representen en mitjana \pm desviació estàndard.

| Grup Terapèutic | Leucòcits/ μ l | | | Nivells de lactat (mmol/l) | | | Nivells de proteïna (g/l) | | |
|--------------------------|--------------------|-----------------|-------------------|----------------------------|-------------------|-------------------|---------------------------|-----------------|------------------|
| | 6 h | 24 h | 26 h [#] | 6 h | 24 h [#] | 26 h [#] | 6 h | 24 h | 26 h |
| Ceftriaxona (CRO) | 3237 \pm 3828 | 7480 \pm 5419 | 15900 \pm 6865 | 6,40 \pm 3,41 | 6,87 \pm 2,73 | 8,70 \pm 4,19 | 2,76 \pm 1,05 | 2,60 \pm 1,00 | 2,96 \pm 0,98 |
| Rifampicina (RIF) | 1158 \pm 1085 | 1176 \pm 873 | 1038 \pm 866 | 4,26 \pm 1,22 | 2,43 \pm 0,58 | 2,85 \pm 1,43 | 1,10 \pm 0,21 | 1,06 \pm 0,51 | 1,33 \pm 0,60* |
| Vancomicina (VAN) | 1057 \pm 692 | 6257 \pm 6392 | 4497 \pm 4571 | 4,35 \pm 1,85 | 3,64 \pm 2,81 | 2,78 \pm 1,18 | 2,77 \pm 1,68 | 1,94 \pm 1,12 | 2,20 \pm 1,07 |
| CRO + RIF | 2087 \pm 1784 | 1645 \pm 1747 | 1102 \pm 1216 | 3,53 \pm 1,17 | 2,10 \pm 0,63 | 2,64 \pm 1,93 | 2,12 \pm 0,96 | 1,79 \pm 0,91 | 2,17 \pm 0,96 |
| CRO + VAN | 3420 \pm 3779 | 4104 \pm 7791 | 2155 \pm 3226 | 4,41 \pm 2,47 | 2,39 \pm 1,14 | 2,74 \pm 1,52 | 2,47 \pm 1,05 | 1,73 \pm 0,94 | 1,60 \pm 0,71* |
| RIF + VAN | 1395 \pm 1619 | 3076 \pm 3452 | 4326 \pm 4928 | 4,50 \pm 2,83 | 2,19 \pm 0,84 | 2,37 \pm 1,25 | 2,58 \pm 1,81 | 1,73 \pm 1,02 | 1,72 \pm 1,34* |
| Control | 2089 \pm 3238 | 3772 \pm 6857 | 3602 \pm 4679 | 5,69 \pm 4,14 | 11,74 \pm 10,34 | 9,31 \pm 5,38 | 3,14 \pm 1,81 | 3,45 \pm 3,09 | 4,54 \pm 2,75 |

* $p < 0,03$ vs grup control (ANOVA).

[#] $p \leq 0,002$ (Kruskal-Wallis)

OBJECTIU 4: “Estudiar l’eficàcia *in vitro* i *in vivo* i la influència en els paràmetres inflamatoris de la fosfomicina combinada com una alternativa terapèutica en el tractament de la meningitis pneumocòcica produïda per soques amb diferent nivell de resistència a penicil·lina i a cefalosporines de tercera generació”.

- 4.1. Estudi de l’activitat *in vitro* / *in vivo* de ceftriaxona, fosfomicina, teicoplanina i vancomicina en monoteràpia envers dues soques amb diferent patró de resistència a β -lactàmics.
- 4.2. Estudi de l’eficàcia *in vitro* / *in vivo* de fosfomicina + ceftriaxona, fosfomicina + teicoplanina i fosfomicina + vancomicina davant de dues soques amb diferent patró de resistència a β -lactàmics. Comparació amb el tractament empíric de ceftriaxona + vancomicina.
- 4.3. Determinació de la resposta inflamatòria en LCR associada a l’administració de cadascun dels règims terapèutics indicats en els apartats anteriors.

Objectius 4.1. - 4.2. - 4.3.

Ribes S, Taberner F, Domenech A, Cabellos C, Tubau F, Liñares J, Viladrich PF, Gudiol F. 2006. Evaluation of fosfomicin alone and in combination with ceftriaxone or vancomycin in an experimental model of meningitis caused by two strains of cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 57(5): 931-6.

L'excel·lent farmacocinètica de la fosfomicina en el LCR és la base de l'estudi de la seva eficàcia en el model de meningitis experimental. La freqüent aparició de mutants resistents durant la monoteràpia limita l'interès de l'estudi al paper de la fosfomicina en combinació.

L'administració endovenosa de fosfomicina va produir concentracions elevades en sang i LCR amb una penetració a través de la BHE de gairebé un 50%. Fosfomicina en solitari va provocar fracàs terapèutic en els conills inoculats amb la soca amb una major CMI i va afavorir el desenvolupament de resistència *in vitro* i *in vivo*.

En les corbes de letalitat es va observar sinergia i efecte additiu en algunes de les combinacions que incorporaven fosfomicina. En el model animal, fosfomicina més ceftriaxona i fosfomicina més vancomicina van ser igual d'eficaces que el tractament estàndard en ambdues soques, van aconseguir reduir la resposta inflamatòria induïda per les monoteràpies i van evitar l'aparició de resistència.

Evaluation of fosfomycin alone and in combination with ceftriaxone or vancomycin in an experimental model of meningitis caused by two strains of cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae*

Sandra Ribes^{1*}, Ferran Taberner¹, Alejandro Domenech¹, Carmen Cabellos¹, Fe Tubau², Josefina Liñares², Pedro Fernández Viladrich¹ and Francesc Gudiol¹

¹Laboratory of Experimental Infection, Infectious Diseases Department, IDIBELL–Hospital Universitari de Bellvitge–Universitat de Barcelona, L'Hospitalet, Barcelona, Spain; ²Microbiology Department, IDIBELL–Hospital Universitari de Bellvitge–Universitat de Barcelona, L'Hospitalet, Barcelona, Spain

Received 18 November 2005; returned 4 January 2006; revised 31 January 2006; accepted 2 February 2006

Objectives: To study the *in vitro* and *in vivo* efficacy of fosfomycin, alone and in combination with ceftriaxone or vancomycin, against two strains of *Streptococcus pneumoniae*: HUB 2349 (fosfomycin and ceftriaxone, MICs 16 and 2 mg/L) and ATCC 51916 (MICs 4 and 32 mg/L).

Methods: Pharmacokinetics/pharmacodynamics data were collected from the study of eight infected animals after a single intravenous dose of 300 mg/kg of fosfomycin. Time–kill curves were plotted using CSF antibiotic concentrations achievable clinically. In the rabbit model, we studied the efficacy and effects on inflammation of treatment with fosfomycin 1200 mg/kg/day, ceftriaxone 100 mg/kg/day and vancomycin 30 mg/kg/day, over 26 h.

Results: Fosfomycin peak level in serum was 324.48 ± 102.1 mg/L at 0.5 h; CSF penetration was 49.2%. Time–kill curves showed that fosfomycin was bactericidal against the ATCC 51916 strain and that the addition of fosfomycin to ceftriaxone or vancomycin was synergic against the HUB 2349 strain. Resistance to fosfomycin was detected both when fosfomycin was studied alone and in combination. In the rabbit model, fosfomycin showed bactericidal activity only against the ATCC 51916 strain. Combinations of fosfomycin with ceftriaxone or vancomycin were bactericidal against both strains; they improved efficacy and decreased CSF inflammatory parameters over monotherapies, without showing statistical differences in comparison with the combination of ceftriaxone and vancomycin.

Conclusions: Fosfomycin in combination with ceftriaxone or vancomycin appeared to be effective for the treatment of experimental cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis. These combinations are possible alternatives in cases of allergy or intolerance to first-line drugs or in rare meningitis caused by highly cephalosporin-resistant pneumococci.

Keywords: pneumococcal meningitis, cephalosporins, *Streptococcus pneumoniae*, resistance

Introduction

The worldwide increase of penicillin- and cephalosporin-resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae* has prompted changes in the treatment of pneumococcal meningitis. However, controlled studies have not yet established the best antibiotic schedule for resistant cases. Most authorities, based on experimental and clinical data, recommend the combination of a third-generation

cephalosporin such as ceftriaxone or cefotaxime with vancomycin as an empirical first-line therapy.^{1–3} Some non- β -lactam antibiotics with anti-pneumococcal activity, such as rifampicin or quinolones, have proven to be effective in the rabbit model of meningitis and have been suggested as possible alternatives, especially for patients with penicillin allergy or for patients infected with strains showing very high cephalosporin resistance.^{4–7} In this setting, other antimicrobial agents with

*Correspondence address. Infectious Diseases Service, Hospital Universitari de Bellvitge, Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. Tel: +34-932607625/+34-934035805; Fax: +34-932607637; E-mail: sribes@ub.edu

anti-pneumococcal activity, alone or in combination, merit further evaluation.

Fosfomycin is a broad-spectrum antibiotic with low molecular weight and negligible protein binding activity which acts by inhibiting the first step of cell wall synthesis.⁸ It exhibits *in vitro* activity against a large number of Gram-positive and Gram-negative bacteria, including both penicillin-susceptible and penicillin-resistant pneumococci.^{9–11} It has a large volume of distribution in human tissues and penetrates well into the CSF of patients with meningitis.^{9,12} Owing to these properties, fosfomycin has been suggested as an alternative for treating CNS infections.^{9,11} However, few experimental studies have addressed this issue. Fosfomycin has been used successfully in a rabbit model of meningitis caused by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*,¹³ but emergence of resistance has been reported during *in vitro* studies when high concentrations were tested.⁸ Nau *et al.* studied the activity of fosfomycin in a rabbit model of pneumococcal meningitis, using a fully susceptible pneumococcal strain.¹⁴ They found that fosfomycin was bactericidal only at very high concentrations and the bactericidal rate at all fosfomycin doses tested was always lower than that of ceftriaxone.

The aim of this study was to determine the *in vitro* and *in vivo* efficacy of fosfomycin, alone and in combination with ceftriaxone or vancomycin, against two strains of drug-resistant *S. pneumoniae* with different patterns of antimicrobial susceptibility. The combination of ceftriaxone with vancomycin was used for comparisons.

Materials and methods

Bacterial strains

Two strains of *S. pneumoniae* belonging to serotype 23F, isolated originally from patients with meningitis, were used. The HUB 2349 strain is a penicillin- and cephalosporin-resistant pneumococcus. The ATCC 51916 strain (Tennessee^{23F}-4 clone) is an intermediate penicillin-resistant and highly cephalosporin-resistant pneumococcus.^{15,16} Both strains are susceptible to fosfomycin, according to the currently accepted breakpoints.¹⁷ The NCCLS (now CLSI) guidelines do not list breakpoints for fosfomycin against *S. pneumoniae*.

MICs and MBCs were determined using the Etest and the microdilution method following the CLSI guidelines.¹⁸ A final concentration of 25 mg/L glucose-6-phosphate was added to the medium for all *in vitro* fosfomycin susceptibility tests.¹⁷ MIC/MBCs (in mg/L) for the HUB 2349 strain were penicillin, 4/4; ceftriaxone, 2/4; fosfomycin, 16/64; and vancomycin, 0.25/0.5; for the ATCC 51916 strain they were penicillin, 0.12/0.25; ceftriaxone, 32/32; fosfomycin, 4/32; and vancomycin, 0.25/0.25.

In vitro studies

Time-kill curves were derived using glass tubes containing a final volume of 10 mL of cation-adjusted Mueller-Hinton broth supplemented with 5% lysed horse blood and a final inoculum of 5×10^5 to 1×10^6 cfu/mL. Antibiotic concentrations achievable in CSF, ranging from 1/4 to $4 \times$ MIC of antibiotics alone, were studied, as were concentrations of 1/4, 1/2 and $1 \times$ MIC of each drug in combination. In addition, ceftriaxone concentrations of 1/16 and $1/8 \times$ MIC were studied against the ATCC 51916 strain. 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 in the initial inoculum of

≥ 3 log cfu/mL. Synergy of a combination was defined as a >2 log cfu/mL reduction over the most active agent alone, with one of the drugs at subinhibitory concentration. Additive effects and indifferent effects were, respectively, defined as a reduction of between 1 and 2 log cfu/mL and of ± 1 log cfu/mL compared with the most active single antibiotic.¹⁹ Emergence of resistance was studied at 24 h using the Etest method.

Meningitis model

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Experiments at the University of Barcelona. The rabbit model of meningitis described originally by Dacey and Sande was modified slightly.²⁰ Young female New Zealand White rabbits were anaesthetized intramuscularly (im) with 35 mg/kg of ketamine (Ketolar; Parke-Davis, Prat de Ll., Spain) and 5 mg/kg of xylazine (Rompum; Bayer AG, Leverkusen, Germany). Meningitis was induced using an intracisternal injection of 250 μ L of a saline suspension containing 10^6 cfu/mL of inoculum. In rabbits infected with the HUB 2349 strain, therapy was started 18 h post-inoculation. Owing to the slow progression of meningitis caused by the strain, therapy was initiated 40 h after inoculation in rabbits infected with the ATCC 51916 strain.²¹ Rabbits were anaesthetized using urethane (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA) at 1.75 g/kg subcutaneously and thiopental sodium (Tiopental; B. Braun Medical S.A., Rubí, Spain) at 5 mg/kg intravenously (iv). A blood sample was collected to assess secondary bacteraemia. Animals were placed in the stereotactic frame and a baseline CSF sample was taken (0 h). Antibiotic iv therapy ($n \geq 8$ rabbits/group) was then administered for 26 h using one of the following therapy schedules: ceftriaxone at 100 mg/kg given once daily, fosfomycin at 300 mg/kg every 6 h, vancomycin at 15 mg/kg every 12 h, fosfomycin plus ceftriaxone, fosfomycin plus vancomycin, and ceftriaxone plus vancomycin. Doses of ceftriaxone and vancomycin were the same as those used in previous experiments.^{6,22} Fosfomycin dosage was chosen in an attempt to obtain CSF levels similar to those achievable in humans with meningitis and taking into account the study by Nau *et al.*¹⁴ Untreated controls ($n \geq 10$) received saline. CSF samples were taken at 2, 6, 24 and 26 h of therapy. Hydration was ensured throughout the experiment. Mortality was assessed at 24 h. Surviving animals were euthanized using a lethal dose of thiopental sodium at the end of each experiment.

Sample processing

CSF samples were used to determine bacterial counts, lactate and protein concentrations, and antibiotic levels at peak and trough time points. The lowest bacterial concentration detectable was 10 cfu/mL. For purposes of analysis, a value of 0.99 log cfu/mL was assigned to the first sterile culture, and a value of 0 log cfu/mL was assigned to the subsequent ones. Changes in bacterial counts (Δ log cfu/mL) were calculated as the difference between bacterial concentrations at the start of therapy and at 2, 6, 24 and 26 h. Therapeutic failure was defined as an increase in bacterial concentration of at least 1 log cfu/mL compared with a previous count. A therapy was considered bactericidal when a reduction of 3 log cfu/mL was achieved. Samples were centrifuged at 5000 g for 10 min, and the supernatants were stored at -70°C . Lactate concentrations were measured using a Lactate PAP kit (Biomérieux S.A., Marcy l'Etoile, France). Protein concentrations were determined using the Bradford method (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany).

Pharmacokinetics

Pharmacokinetics data were compiled from a study of eight infected animals after a single iv dose of 300 mg/kg of fosfomycin,

Evaluation of fosfomycin in an experimental model of meningitis

100 mg/kg of ceftriaxone or 15 mg/kg of vancomycin. Blood and CSF samples were taken at different time points, according to each therapy. A computer-assisted method (PK functions for Microsoft Excel; J. I. Usansky, A. Desai and D. Tang-Liu, Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan, Irvine, CA 92606, USA) was used to determine the following parameters in serum and CSF: maximum concentration (C_{max}), area under the concentration–time curve over 24 h (AUC_{0-24}) and CSF penetration as the comparison of areas under the curve ($AUC_{CSF\ 24}/AUC_{serum\ 24}$).

Antibiotic assays

Ceftriaxone and fosfomycin concentrations were measured using the agar disc diffusion method, using *Bacillus subtilis* ATCC 12432 and *Proteus vulgaris* ATCC 21100, respectively, as assay organisms. Vancomycin levels were determined using fluorescent polarization immunoassay (FPIA).

Statistical analysis

Comparisons between groups were performed using the ANOVA test (followed by the Tunkel multiple-comparison test) if data were normally distributed and the Kruskal–Wallis test if data were not normally distributed. For analyses, inflammatory data comparisons between two groups were performed using the Mann–Whitney test. A *P* value of <0.05 was considered significant.

Results

In vitro studies

Although samples were removed at 0, 6 and 24 h of incubation, viable plate counts were considered only at 0 and 6 h because *S. pneumoniae* frequently underwent autolysis at 24 h (we observed spontaneous autolysis at 24 h in all killing curves with a bacterial growth >6.5 log cfu/mL at 6 h). A bactericidal effect was reached only with vancomycin at achievable concentrations in CSF (0.25–1 mg/L) against both strains and with

fosfomycin at high concentration (32 mg/L) against ATCC 51916 (MICs: ceftriaxone, 32 mg/L; fosfomycin, 4 mg/L). Synergy and additive effect were observed when fosfomycin was combined with ceftriaxone against HUB 2349 (MICs: ceftriaxone, 2 mg/L; fosfomycin, 16 mg/L). An indifferent effect was noted in all combinations of fosfomycin and ceftriaxone against ATCC 51916. The addition of fosfomycin to vancomycin was synergic against HUB 2349 and showed an additive effect against ATCC 51916. Resistant mutants were demonstrated readily for both strains after 24 h of exposure to fosfomycin alone and in combination, with a 4- to 256-fold increase in MIC values.

Pharmacokinetics

Fosfomycin peak level in serum was 324.48 ± 102.1 mg/L at 0.5 h and in CSF was 35.07 ± 8.59 mg/L at 1 h. The maximum ceftriaxone concentration found in serum was 28.82 ± 9.13 mg/L at 0.5 h and in CSF was 3.65 ± 1.96 mg/L at 2 h. Vancomycin peak level in serum was 38.96 ± 6.54 mg/L at 0.5 h and in CSF was 0.91 ± 0.34 mg/L at 2 h. CSF penetration was 49.2, 28.4 and 14.6% for fosfomycin, ceftriaxone and vancomycin, respectively.

Pharmacodynamics

The true pharmacodynamic parameter related to MIC for each antibiotic is included in Table 1.

Experimental meningitis caused by the HUB 2349 strain

Secondary bacteraemia at 0 h in different groups ranged from 75 to 100%. Mortality at 24 h was 30% in the control group and 0% in all the therapy groups. Table 1 shows CSF bacterial counts at 0 h and CSF bacterial reduction at 24 h with the different schedules. Antibiotic levels in the CSF of rabbits infected with the HUB 2349 strain are summarized in Table 2. Lactate and protein concentrations in CSF at 24 h are summarized in Table 3. Fosfomycin alone failed in the two animals that presented the lowest CSF levels (concentrations of 40.54 and 39.09 mg/L at 26 h) and

Table 1. Initial bacterial concentrations and bacterial killing rates in CSF of rabbits with pneumococcal meningitis caused by the HUB2349 strain (MICs: FOF, 16 mg/L; CRO, 2 mg/L) and the ATCC 51916 strain (MICs: FOF, 4 mg/L; CRO, 32 mg/L)

| Therapy group (dose in mg/kg/day) | HUB 2349 strain | | | | ATCC 51916 strain | | | |
|--------------------------------------|--------------------------------|--|---|---|--------------------------------|---|---|---|
| | initial titres (log cfu/mL) | bacterial decreases (Δ log cfu/mL) at 24 h | no. of animals with sterile CSF cultures at 24 h/total | PD parameter related to MIC ^a | initial titres (log cfu/mL) | bacterial decreases (Δ log cfu/mL) at 24 h | no. of animals with sterile CSF cultures at 24 h/total | PD parameter related to MIC ^a |
| FOF 1200 | 4.55 ± 0.40 | -2.46 ± 1.77 | 5/9 | 3.65 | 5.16 ± 0.89 | -4.29 ± 0.86 [†] | 9/9 | 11.96 |
| CRO 100 | 4.55 ± 0.47 | -3.38 ± 1.38 | 8/9 | 5.94% | 5.23 ± 0.88 | -0.75 ± 1.72 | 0/8 | 0% |
| VAN 30 | 4.45 ± 0.55 | -3.85 ± 0.73 | 10/10 | 37.82 h | 5.00 ± 0.76 | -3.44 ± 1.47 [†] | 6/8 | 37.82 h |
| FOF + CRO | 4.89 ± 1.02 | -4.52 ± 0.84* | 8/8 | | 4.91 ± 0.78 | -4.78 ± 0.73 [†] | 8/8 | |
| FOF + VAN | 4.59 ± 0.66 | -4.30 ± 0.97* | 8/8 | | 4.85 ± 0.59 | -4.23 ± 0.63 [†] | 8/8 | |
| CRO + VAN | 4.48 ± 0.57 | -4.24 ± 0.74* | 8/8 | | 5.17 ± 1.14 | -4.25 ± 1.17 [†] | 8/8 | |
| Control | 4.59 ± 1.04 | 0.97 ± 1.94 | 0/10 | | 4.78 ± 0.84 | 1.12 ± 2.09 | 0/12 | |

FOF, fosfomycin; CRO, ceftriaxone; VAN, vancomycin.

Data are expressed as means ± SD.

^aPD parameters were C_{max}/MIC for fosfomycin; $t > MIC$ for ceftriaxone; and AUC/MIC for vancomycin.

**P* < 0.05 against FOF monotherapy (ANOVA test).

[†]*P* < 0.05 against CRO monotherapy (ANOVA test).

Table 2. Mean (\pm SD) antibiotic concentrations (mg/L) in CSF of rabbits with pneumococcal meningitis caused by two tested strains of *Streptococcus pneumoniae*

| Antibiotics (doses in mg/kg/day) ^a | HUB 2349 strain | | | | ATCC 51916 strain | | | |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------------------|-------------------|
| | 2 h | 6 h | 24 h | 26 h | 2 h | 6 h | 24 h | 26 h |
| CRO 100 | 3.30 \pm 1.54 | 2.30 \pm 0.98 | 0.64 \pm 0.12 | 3.23 \pm 0.97 | 4.61 \pm 2.74 | 1.76 \pm 0.89 | 0.30 \pm 0.02 ^b | 4.84 \pm 3.06 |
| FOF 1200 | 58.40 \pm 21.81 | 36.64 \pm 15.58 | 37.05 \pm 23.18 | 66.27 \pm 29.63 | 47.82 \pm 16.86 | 31.52 \pm 15.13 | 30.46 \pm 11.58 | 50.95 \pm 21.45 |
| VAN 30 | 1.93 \pm 1.06 | 1.21 \pm 0.49 | 0.80 \pm 0.29 | 1.89 \pm 1.11 | 1.01 \pm 0.59 | 0.52 \pm 0.16 | 0.39 \pm 0.25 | 1.44 \pm 1.27 |

CRO, ceftriaxone; FOF, fosfomicin; VAN, vancomycin.

^aCeftriaxone was administered twice (at 0 and 24 h), vancomycin three times (at 0, 12 and 24 h) and fosfomicin every 6 h [at 0, 6, 12 (double dose) and 24 h].

^bTrough concentrations were detected in samples from two animals only. The remainder of the samples were below the level of detection (0.25 mg/L).

Table 3. CSF lactate (mmol/L) and protein (g/L) concentrations at 24 h in rabbits with pneumococcal meningitis caused by two strains of *Streptococcus pneumoniae*

| Therapy group (dose in mg/kg/day) | HUB 2349 strain | | ATCC 51916 strain | |
|-----------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------|--------------------|
| | CSF lactate levels | CSF protein levels | CSF lactate levels | CSF protein levels |
| FOF 1200 | 4.37 \pm 1.17 | 1.92 \pm 0.87 | 4.41 \pm 2.63 | 1.79 \pm 0.68 |
| CRO 100 | 3.20 \pm 0.50 | 1.98 \pm 1.17 | 6.87 \pm 2.73 | 2.60 \pm 1.00 |
| VAN 30 | 3.37 \pm 0.82 | 2.24 \pm 0.99 | 3.64 \pm 2.81 [†] | 1.94 \pm 1.12 |
| FOF + CRO | 3.15 \pm 0.73 | 1.67 \pm 0.71 | 3.93 \pm 2.70 [†] | 1.98 \pm 1.30 |
| FOF + VAN | 2.92 \pm 0.93 | 1.55 \pm 0.85 | 2.56 \pm 0.72* [†] | 1.59 \pm 0.87 |
| CRO + VAN | 2.93 \pm 0.99 | 1.94 \pm 0.80 | 2.39 \pm 1.14* [†] | 1.73 \pm 0.94 |
| Control | 6.90 \pm 5.84 | 2.53 \pm 1.08 | 11.74 \pm 10.34 | 3.45 \pm 3.09 |

FOF, fosfomicin; CRO, ceftriaxone; VAN, vancomycin.

Data are expressed as means \pm SD.

* $P < 0.05$ against CRO monotherapy (Mann–Whitney test).

[†] $P < 0.05$ against the control group (Mann–Whitney test).

in two others that had high CSF levels but a 10-fold increase in fosfomicin MIC value at 24 h. The remainder of the fosfomicin-treated animals (5/9) had CSF cultures below the level of detection after 24 h of therapy. Ceftriaxone was bactericidal in eight out of nine animals, but failed in the remaining one. Vancomycin was bactericidal from 6 h and no re-growth was observed. The addition of fosfomicin to ceftriaxone or vancomycin improved the efficacy of both antibiotics tested alone, being statistically significant compared with fosfomicin monotherapy ($P < 0.05$), and decreased lactate and protein levels (though the differences were not statistically significant). In fosfomicin combinations, all CSF cultures were below the level of detection from 24 h and no resistant mutants were observed. The efficacy of fosfomicin combinations was similar to that provided by the combination of ceftriaxone with vancomycin.

Experimental meningitis caused by the ATCC 51916 strain

Secondary bacteraemia at 0 h in different groups ranged from 62.5 to 100%. Mortality at 24 h was 58.3% in control animals and 0% in all therapeutic regimens. Initial CSF bacterial concentrations and bacterial decreases at 24 h of different regimens are summarized in Table 1. CSF drug levels of rabbits with meningitis caused by the ATCC 51916 strain are shown in Table 2. CSF inflammatory parameters at 24 h are shown in Table 3. Fosfomicin was almost bactericidal from 6 h and no re-growth

was observed. Ceftriaxone showed a bacteriostatic effect, and therapeutic failure occurred in three out of eight animals. Vancomycin reached a bactericidal effect at 24 h but therapeutic failure occurred in 1 out of 10 animals that presented the lowest CSF vancomycin levels (0.03 mg/L). All regimens were significantly more effective than ceftriaxone alone at 24 h ($P < 0.05$). The use of fosfomicin in combination with ceftriaxone or vancomycin improved activities and decreased CSF levels of lactate and protein in comparison with antibiotics tested alone (no statistical differences). All fosfomicin-treated animals had CSF cultures below the level of detection from 24 h and no emergence of resistance was noted. The efficacy of fosfomicin combinations was similar to that provided by the combination of ceftriaxone with vancomycin.

Discussion

The potential interest in the use of fosfomicin in the therapy of CNS infections is based on its *in vitro* activity against most bacterial pathogens that causes meningitis and on its good penetration across the blood–brain barrier. Our findings of $\sim 50\%$ penetration of fosfomicin into CSF add evidence to previous reports of its favourable CSF kinetics.^{12,23} Using a fosfomicin dose of 300 mg/kg/6 h, we attained peak CSF levels, ranging from 35 to 60 mg/L, similar to those observed in humans

Evaluation of fosfomycin in an experimental model of meningitis

receiving high iv doses. In a study of 12 patients with pneumococcal meningitis, iv administration of 16 g daily led to a CSF fosfomycin level of 52.2 mg/L within 3 days of treatment.²³ In another series of 10 patients with bacterial meningitis, mean peak CSF levels of 31 mg/L on the second day and 37.2 mg/L on the fifth day were achieved using a dose of 200 mg/kg/day.¹² Furthermore, even in the presence of an intact blood-brain barrier, fosfomycin penetrates into the CSF to some extent.²⁴ These kinetic characteristics presumably mean that its penetration would not be affected by the concomitant use of dexamethasone.

In this experiment we used two penicillin-resistant pneumococcal strains belonging to the 23F serotype, with different phenotypes. The susceptibility pattern of the HUB 2349 strain is common among penicillin-resistant pneumococci causing meningitis, whereas that of the ATCC 51916 strain is very rare. The use of both strains helped us to better explore the possibilities of fosfomycin use alone and in combination.

In the *in vitro* studies, at levels achievable in human CSF, fosfomycin was bactericidal against ATCC 51916 (MIC/MBC to fosfomycin of 4/32 mg/L) but was unable to produce a bactericidal effect against HUB 2349 (MIC/MBC to fosfomycin of 16/64 mg/L). Fosfomycin showed bactericidal activity only against ATCC 51916 in the rabbit model as well.

The pharmacodynamics of fosfomycin in the CNS is not well known. It has been suggested that high C_{max} values are not essential as the drug exerts a non-concentration-dependent *in vitro* bacterial growth inhibition of *S. aureus*.¹¹ However, in the rabbit meningitis model Nau *et al.* observed that a CSF concentration of at least 10 times the MIC of the tested strain was necessary to produce a rapid bacterial killing of *S. pneumoniae*.¹⁴ This is in accordance with our study, where a bactericidal effect was obtained *in vitro* but in the animal model only when fosfomycin concentrations were eight times the MIC value, a condition unattainable with the HUB 2349 strain. Whatever parameter best predicts fosfomycin efficacy, the MIC of the causative strain is of paramount importance. It is widely accepted that most pneumococci are susceptible to fosfomycin, regardless of their susceptibility to penicillin; however, for penicillin-susceptible strains fosfomycin MICs tend to be lower (from 1 to 8 mg/L) than for penicillin-resistant strains (from 8 to 64 mg/L).^{9,10,14} In addition, fosfomycin MBCs are usually 2- to 4-fold higher than MICs. Our data suggest that for meningeal infections fosfomycin breakpoints should be revised and that strains with MICs ≥ 16 mg/L should be regarded as non-susceptible.

The efficacy shown by ceftriaxone and vancomycin as single agents, both *in vitro* and in the rabbit model, was in accordance with previous reported studies.^{6,22,25} Failures were rare but occurred with either agent once CSF levels declined in comparison with the average from the other animals. Furthermore, in the particular case of meningitis caused by ATCC 51916, ceftriaxone did not show bactericidal effect.²⁶

Several investigators have reported *in vitro* synergy between β -lactams and fosfomycin against penicillin-resistant pneumococcal strains.^{27,28} *In vivo*, using an experimental fibrin clot pneumococcal infection model in rabbits, Chavanet *et al.* demonstrated that combinations of fosfomycin with ceftriaxone increased bacterial reduction and delayed re-growth.²⁹ In the rabbit model of meningitis caused by a fully susceptible *S. pneumoniae* type 3 strain, the combination of the two antibiotics produced an additive effect.¹⁴ In our study, the combination of fosfomycin with ceftriaxone was synergic only against the

strain with higher MIC to fosfomycin *in vitro*, whereas in the animal model the combination improved the antibacterial activity against both strains.

Little information is available on the activity of combinations of fosfomycin with vancomycin against pneumococci. In an *in vitro* study of 26 pneumococcal strains, bactericidal activity of vancomycin was unaffected by the addition of fosfomycin.²⁵ In our study, the efficacy of this combination was similar to that observed for the combination of fosfomycin with ceftriaxone: *in vitro* synergy against the strain with higher MIC of fosfomycin and improvement of antibacterial activity against both strains in rabbits.

The combination of fosfomycin with ceftriaxone was slightly more effective than the other combined therapies, including the reference combination of ceftriaxone with vancomycin, although the differences were not significant.

The specific mechanisms of action of different antibiotics may induce differences in the release of pneumococcal cell wall components. Among antibiotics acting against the bacterial cell wall we have found only that CSF lactate and protein levels with ceftriaxone are statistically higher than those observed with combinations of fosfomycin with vancomycin ($P = 0.000$) and ceftriaxone with vancomycin ($P = 0.001$) in groups of rabbits infected with the ATCC 51916 strain. This increase of CSF lactate and protein levels may be attributable to the lack of activity that ceftriaxone has against this strain.

Development of resistance to fosfomycin was a frequent phenomenon *in vitro* when fosfomycin was studied alone and in combination against both strains. In the animal model, the use of fosfomycin in combination prevented the emergence of drug-resistant populations. The discordance between the emergence of resistant mutants *in vitro* and in the animal model has been observed previously with other drugs such as rifampicin.³⁰ The emergence of resistant mutants during therapy precludes the use of both rifampicin and fosfomycin as single agents in clinical practice. The possible role of fosfomycin combinations described in our study parallels to some extent that of rifampicin combinations: both may be used as alternatives to the standard ceftriaxone with vancomycin combination therapy in patients with allergy or intolerance to the reference drugs or in rare cases of infection with pneumococcal strains showing very high cephalosporin resistance.

In conclusion, the anti-pneumococcal activity of fosfomycin, at CSF achievable concentrations, is greatly affected by the MIC of the infecting strain. This, coupled with the frequent emergence of resistance during therapy, precludes its use as single agent. However, combinations of fosfomycin with ceftriaxone and vancomycin improve the activity of either drug used alone and are as effective as the reference combination of ceftriaxone with vancomycin. Accordingly, fosfomycin combinations might be considered as alternatives in cases of allergy or intolerance to first-line drugs or in rare cases of meningitis caused by pneumococcal strains showing very high resistance to cephalosporin.

Acknowledgements

This study was supported by a grant FIS 01/1235 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), National Health Service, Spain. S. R., F. T. and A. D. were supported by grants from IDIBELL and Universitat de Barcelona. All authors are members of the Spanish Network for the Research in Infectious Disease (REIPI).

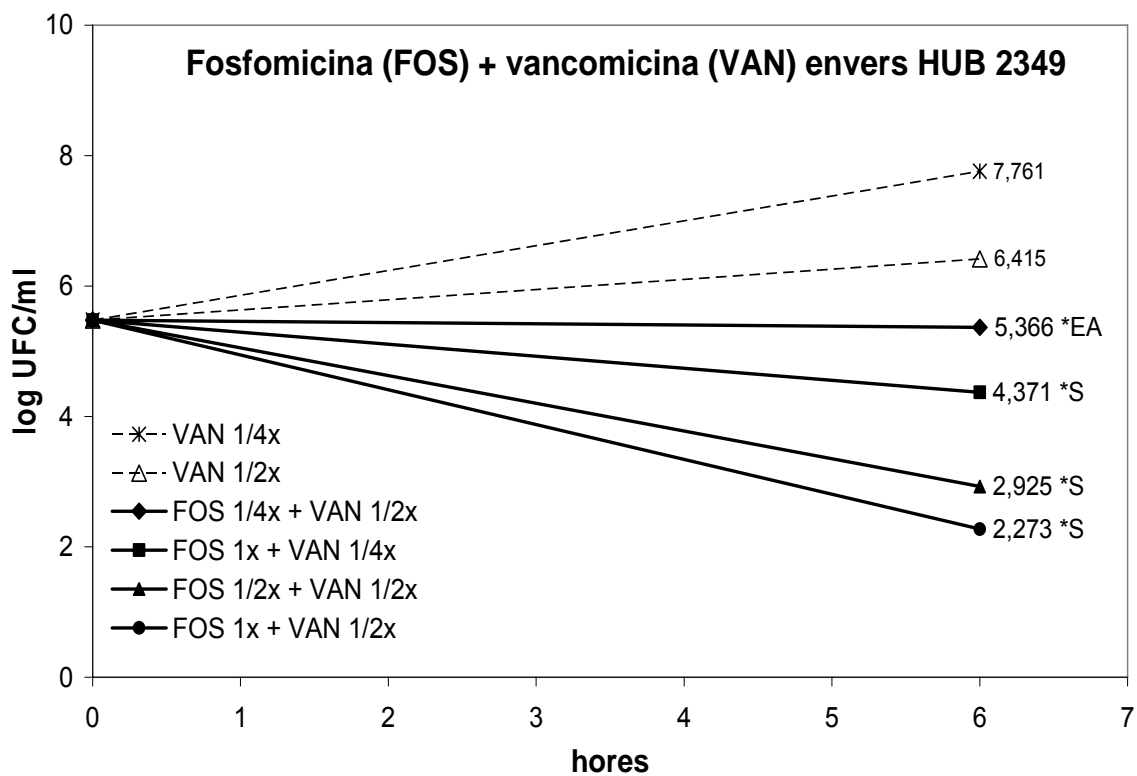
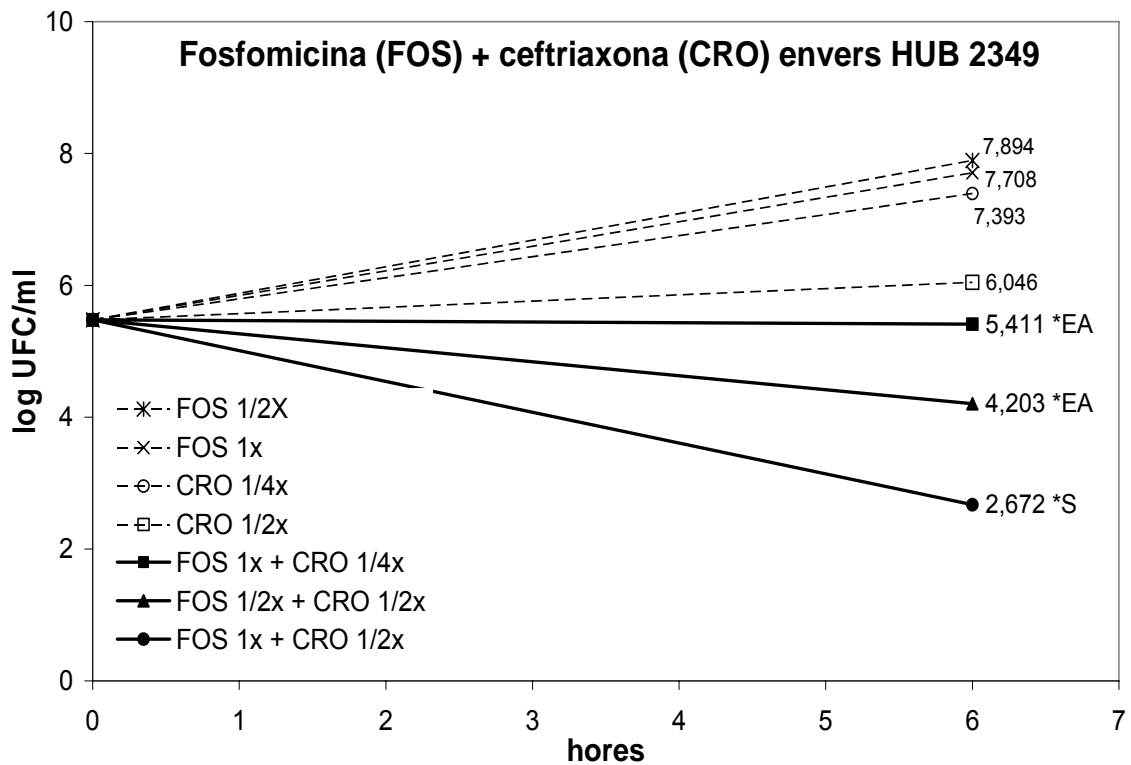
Transparency declarations

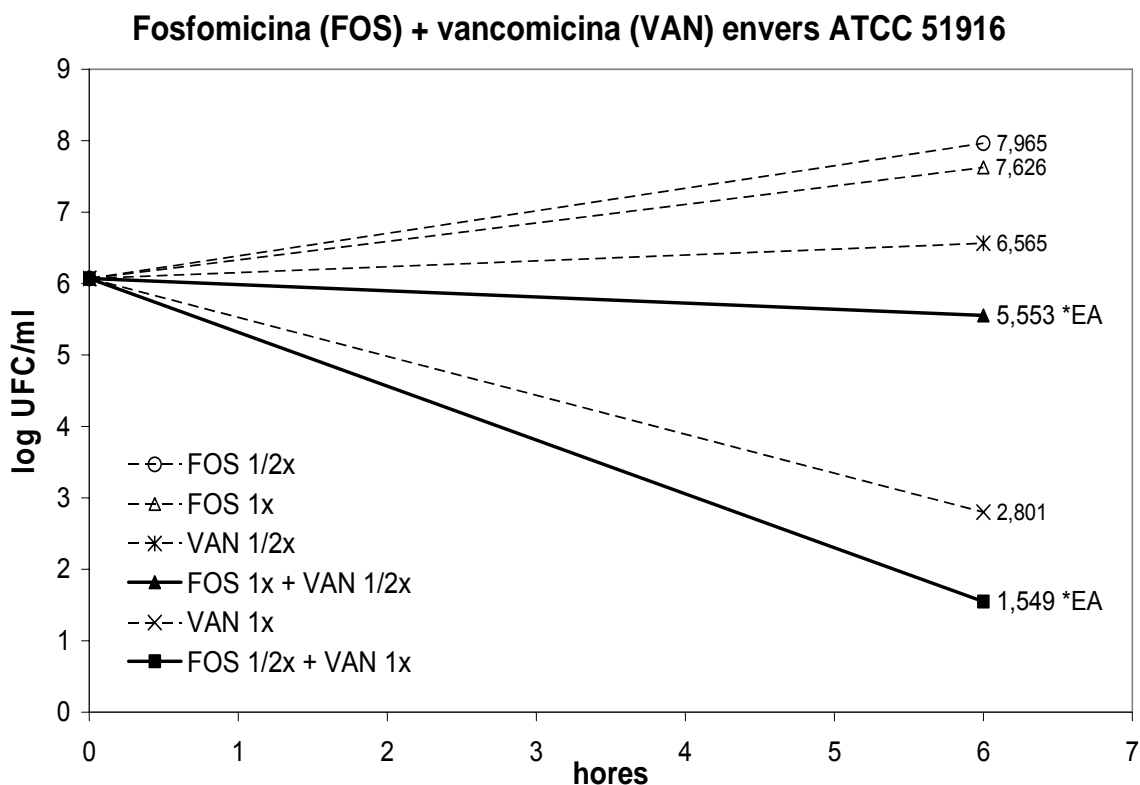
None to declare.

References

- Friedland IR, McCracken GH, Jr. Management of infections caused by antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *N Engl J Med* 1994; **331**: 377–82.
- American Academy of Pediatrics. Therapy for children with invasive pneumococcal infections. *Pediatrics* 1997; **99**: 289–9.
- Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL *et al.* Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis* 2004; **39**: 1267–84.
- Nau R, Kaye K, Sachdeva M *et al.* Rifampin for therapy of experimental pneumococcal meningitis in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; **38**: 1186–9.
- Perrig M, Acosta F, Cottagnoud M *et al.* Efficacy of gatifloxacin alone and combined with cefepime against penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in a rabbit meningitis model and *in vitro*. *J Antimicrob Chemother* 2001; **47**: 701–4.
- Martinez-Lacasa J, Cabellos C, Martos A *et al.* Experimental study of the efficacy of vancomycin, rifampicin and dexamethasone in the therapy of pneumococcal meningitis. *J Antimicrob Chemother* 2002; **49**: 507–13.
- Domenech A, Cabellos C, Ribes S *et al.* Experimental study of clinafloxacin alone and in combination in the treatment of ciprofloxacin-susceptible and -resistant pneumococcal meningitis. *Microb Drug Resist* 2003; **9** Suppl 1: S53–9.
- Hendlin D, Stapley EO, Jackson M *et al.* Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of streptomycetes. *Science* 1969; **166**: 122–3.
- Sicilia T, Estevez E, Rodriguez A. Fosfomicin penetration into the cerebrospinal fluid of patients with bacterial meningitis. *Chemotherapy* 1981; **27**: 405–13.
- Banon Arias R, Garcia Lopez M, Pinedo Sanchez A. Time-kill evaluation of antimicrobial regimens against clinical isolates of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *J Chemother* 2001; **13**: 535–40.
- Pfausler B, Spiss H, Dittrich P *et al.* Concentrations of fosfomicin in the cerebrospinal fluid of neurointensive care patients with ventriculostomy-associated ventriculitis. *J Antimicrob Chemother* 2004; **53**: 848–52.
- Stahl JP, Croize J, Bru JP *et al.* Diffusion of fosfomicin into the cerebrospinal fluid in purulent meningitis. *Presse Med* 1984; **13**: 2693–5.
- Guggenbichler JP, Menardi G, Hager J. Antimicrobial therapy of bacterial meningitis in premature- and newborn infants and shunt infections. In: Guggenbichler JP, ed. *New Aspects for Treatment with Fosfomicin*, New York: Springer, 1987: 41–57.
- Nau R, Zysk G, Reinert RR *et al.* Activity of fosfomicin in a rabbit model of experimental pneumococcal meningitis. *J Antimicrob Chemother* 1995; **36**: 997–1004.
- Sloas MM, Barrett FF, Chesney PJ *et al.* Cephalosporin treatment failure in penicillin- and cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 1992; **11**: 662–6.
- McGee L, McDougal L, Zhou J *et al.* Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 2565–71.
- Andrews JM, Baquero F, Beltran JM *et al.* International collaborative study on standardization of bacterial sensitivity to fosfomicin. *J Antimicrob Chemother* 1983; **12**: 357–61.
- 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.
- Eliopoulos GM, Moellering RC, Jr. Antimicrobial combinations. In: Lorian V, ed. *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4th edn. Baltimore: Williams & Wilkins Co., 1996; 330–6.
- Dacey RG, Sande MA. Effect of probenecid on cerebrospinal fluid concentrations of penicillin and cephalosporin derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* 1974; **6**: 437–41.
- Ribes S, Domenech A, Cabellos C *et al.* Experimental meningitis due to a high-level cephalosporin-resistant strain of *Streptococcus pneumoniae* serotype 23F. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; **21**: 329–33.
- Cabellos C, Martinez-Lacasa J, Tubau F *et al.* Evaluation of combined ceftriaxone and dexamethasone therapy in experimental cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis. *J Antimicrob Chemother* 2000; **45**: 315–20.
- Sicilia T, Fadon A, Rodriguez A *et al.* Fosfomicin in pneumococcal meningitis. *Chemotherapy* 1977; **23** Suppl 1: 429–40.
- Kuhn E, Pfeifer G, Frenkel C. Penetration of fosfomicin into cerebrospinal fluid across non-inflamed and inflamed meninges. *Infection* 1987; **15**: 422–4.
- Doit CP, Bonacorsi SP, Fremaux AJ *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.
- Ribes S, Taberner F, Domenech A *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 Chemother* 2005; **56**: 979–82.
- Barakett V, Lesage D, Delisle F *et al.* Synergy of cefotaxime and fosfomicin against penicillin-resistant pneumococci. *J Antimicrob Chemother* 1993; **31**: 105–9.
- Cassinat B, Nicolas MH. Comparison of antibiotic combinations against penicillin-resistant pneumococci. *J Antimicrob Chemother* 1994; **34**: 785–90.
- Chavanet P, Beloeil H, Pechinot A *et al.* *In vivo* activity and pharmacodynamics of cefotaxime or ceftriaxone in combination with fosfomicin in fibrin clots infected with highly penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**: 1736–43.
- 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.

Objectius 4.1. - 4.2. La informació referent a les corbes de letalitat és molt reduïda en l'article anterior. A continuació es representa gràficament les corbes amb fosfomicina més ceftriaxona o vancomicina que van exhibir efecte additiu (*EA) i/o sinergia (*S).

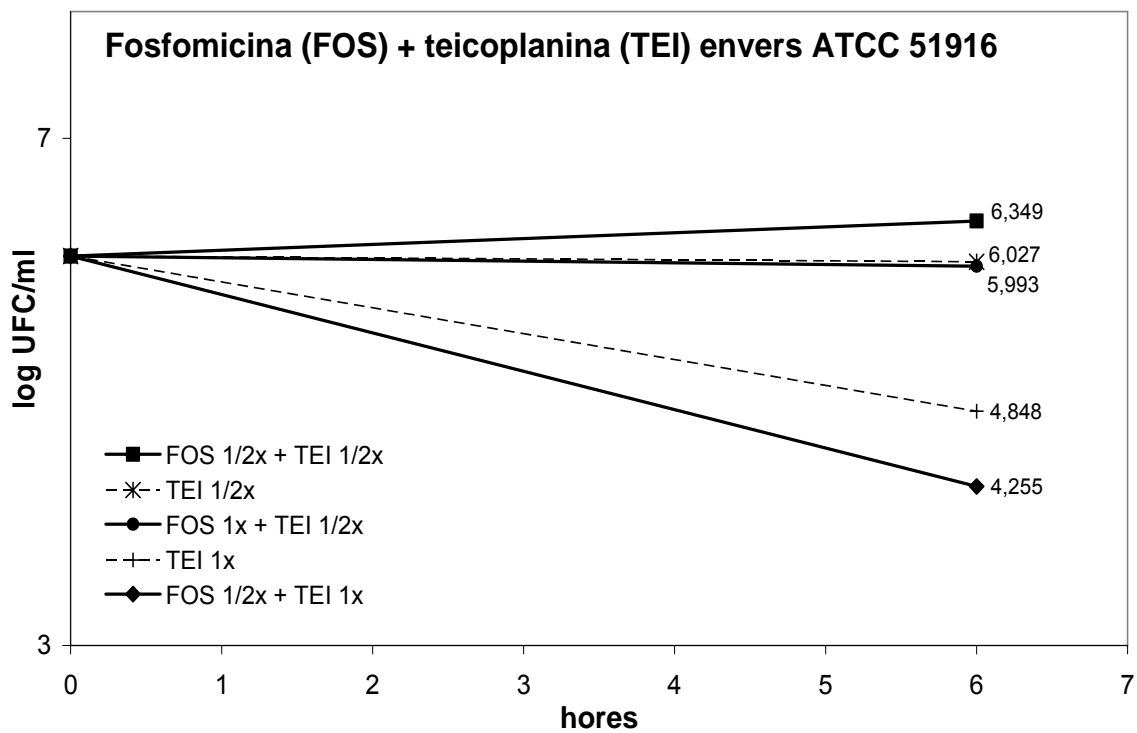
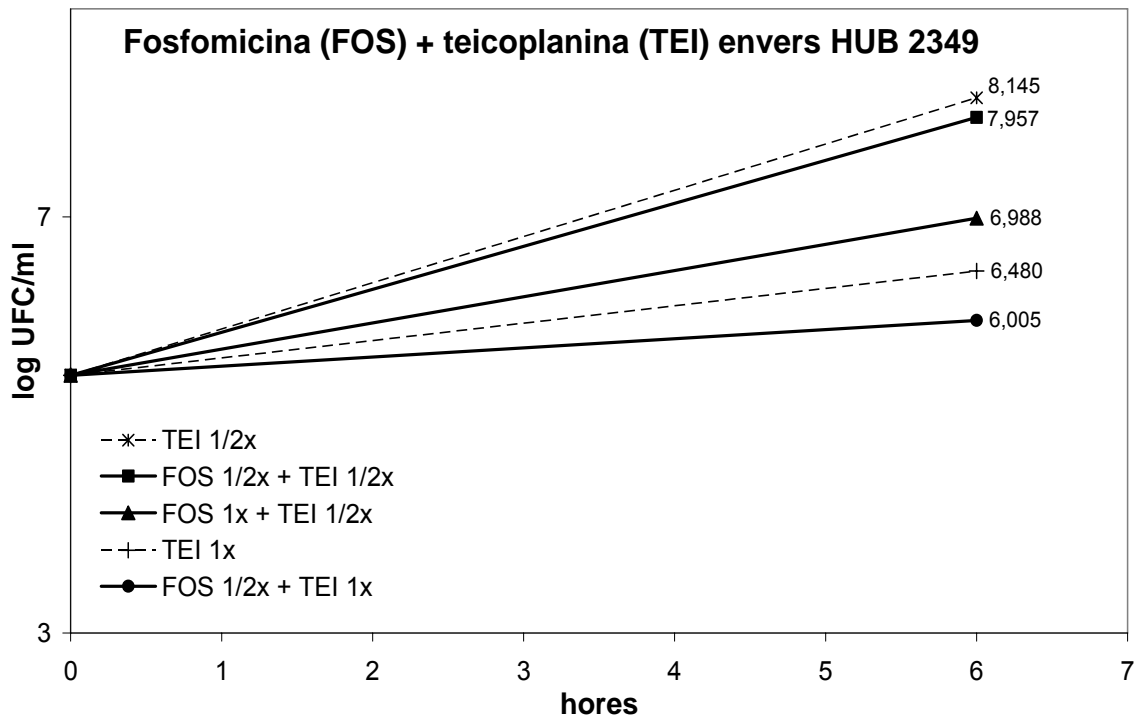




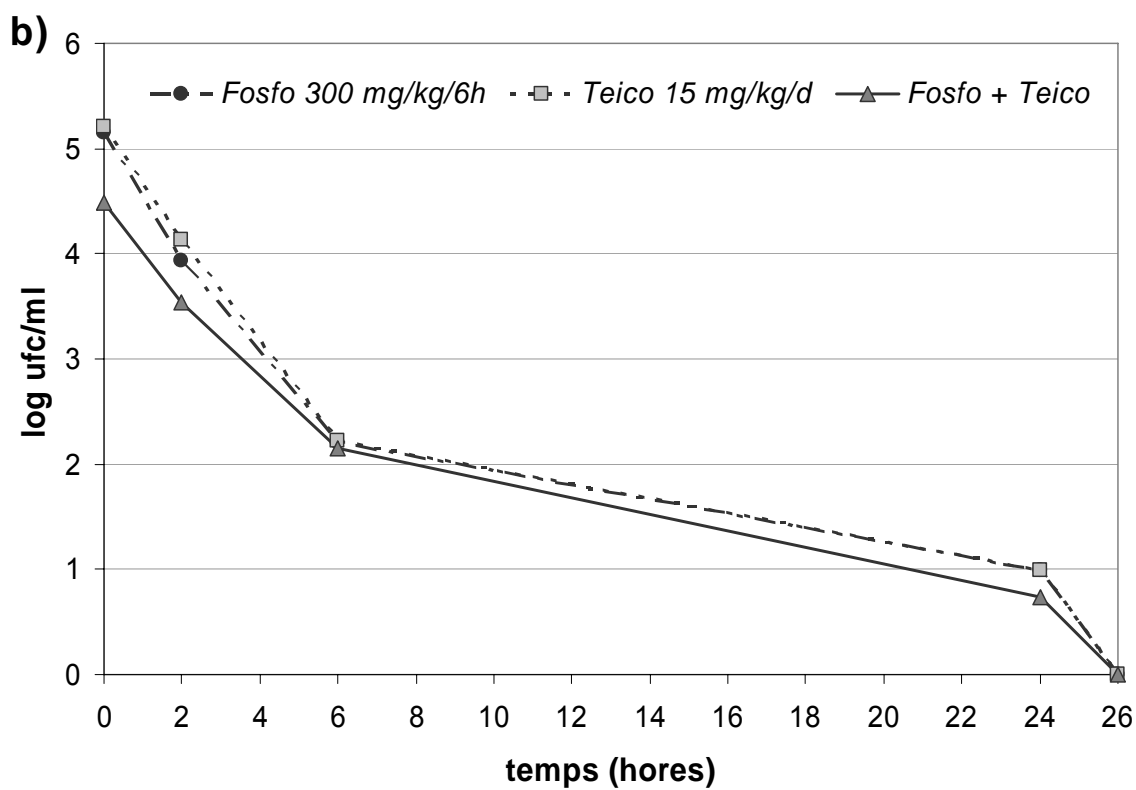
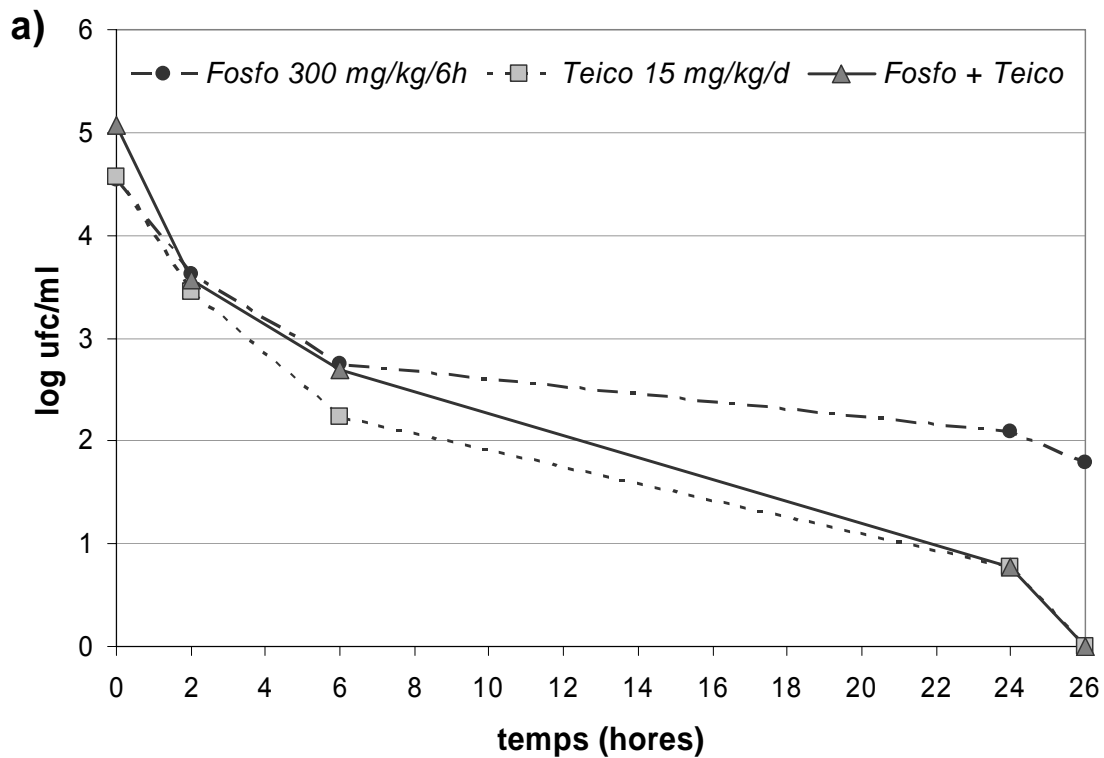
Les dades sobre l'activitat *in vitro* de teicoplanina +/- fosfomicina no s'inclouen en l'article. La següent taula representa les activitats dels antibiòtics en solitari a diferents concentracions a les 6 i 24 h d'incubació. A les 24 h es va detectar mutants resistents a fosfomicina (^R) en alguna de les corbes estudiades.

| | | $\Delta \log \text{UFC/ml } 6 \text{ h}$ | | $\Delta \log \text{UFC/ml } 24 \text{ h}$ | |
|---------------------|--------|--|-------------------|---|---------------------|
| | | <i>HUB 2349</i> | <i>ATCC 51916</i> | <i>HUB 2349</i> | <i>ATCC 51916</i> |
| Fosfomicina | 8 xCMI | -2,034 | -3,737 | 0,900 ^R | -2,369 ^R |
| | 1 xCMI | 2,231 | 1,554 | -1,986 | -2,690 |
| | ½ xCMI | 2,417 | 1,893 | -1,703 | -2,688 |
| | ¼ xCMI | 2,646 | 2,115 | -2,034 | -1,862 |
| Teicoplanina | 8 xCMI | -0,368 | -2,349 | -4,264 | -4,965 |
| | 4 xCMI | -0,570 | -1,765 | -4,248 | -4,787 |
| | 1 xCMI | 1,003 | -1,224 | 1,483 | -2,023 |
| | ½ xCMI | 2,668 | -0,045 | 0,849 | 0,302 |
| | ¼ xCMI | 2,568 | 1,194 | 1,048 | -0,912 |

Totes les corbes que inclouen fosfomicina més teicoplanina van mostrar indiferència a l'hora 6. Alguns exemples es resumeixen a continuació:



Objectius 4.1. - 4.2. - 4.3. La informació referent a l'eficàcia de fosfomicina i teicoplanina soles i en combinació en el conill envers la soca HUB 2349 (a) i ATCC 51916 (b) es representa a continuació en gràfiques concentració-temps.



Per ambdues soques, es va observar concordança entre els resultats *in vitro* i els obtinguts en el model animal en els què l'addició de fosfomicina no va suposar una millora significativa en l'activitat de la teicoplanina en solitari. En canvi, l'aparició de mutants resistents en les corbes de letalitat que incorporaven fosfomicina sola o combinada no es va correlacionar amb l'efecte protector que la combinació va demostrar en el conill.

Respecte l'activitat inflamatòria que es va generar en LCR, l'administració de teicoplanina combinada amb fosfomicina davant d'ambdues soques va produir uns nivells de leucòcits, lactat i proteïna menors que els obtinguts amb les monoteràpies sense que les diferències fossin estadísticament significatives. A continuació es detallen els valors dels paràmetres inflamatoris per ambdues soques.

Nivells de leucòcits (cèl·lules/ μ l), lactat (mmol/l) i proteïna (g/l) en el LCR de conills tractats amb fosfomicina i teicoplanina en solitari i en combinació. Les dades es representen en mitjana \pm desviació estàndard.

| <i>Paràmetre</i> | <i>hora</i> | <i>Fosfomicina 300 mg/kg/6h</i> | | <i>Teicoplanina 15 mg/kg/d</i> | | <i>Fosfomicina + Teicoplanina</i> | |
|------------------|-------------|---------------------------------|-------------------|--------------------------------|-------------------|-----------------------------------|-------------------|
| | | <i>HUB 2349</i> | <i>ATCC 51916</i> | <i>HUB 2349</i> | <i>ATCC 51916</i> | <i>HUB 2349</i> | <i>ATCC 51916</i> |
| <i>Leucòcits</i> | 6 | 9080 \pm 9009 | 2733 \pm 2105 | 5649 \pm 2909 | 2080 \pm 2702 | 3953 \pm 2882 | 1865 \pm 1853 |
| | 24 | 4148 \pm 3960 | 9094 \pm 6763 | 7956 \pm 6751 | 4696 \pm 6666 | 3800 \pm 3243 | 2114 \pm 3085 |
| | 26 | 4587 \pm 3549 | 5321 \pm 5121 | 8435 \pm 4757 | 3036 \pm 2694 | 2628 \pm 2950 | 2144 \pm 2858 |
| <i>Lactat</i> | 6 | 6,94 \pm 1,12 | 6,68 \pm 2,06 | 6,46 \pm 1,62 | 5,84 \pm 2,78 | 5,44 \pm 1,64 | 4,16 \pm 2,27 |
| | 24 | 4,37 \pm 1,17 | 4,41 \pm 2,63 | 4,07 \pm 2,11 | 2,60 \pm 0,91 | 3,16 \pm 0,48 | 2,45 \pm 0,91 |
| | 26 | 5,05 \pm 1,27 | 4,27 \pm 1,96 | 4,26 \pm 1,77 | 4,99 \pm 2,38 | 2,98 \pm 0,65 | 3,67 \pm 1,87 |
| <i>Proteïnes</i> | 6 | 2,64 \pm 1,33 | 2,78 \pm 1,34 | 2,20 \pm 0,99 | 2,48 \pm 1,45 | 1,90 \pm 1,22 | 2,02 \pm 1,12 |
| | 24 | 1,92 \pm 0,87 | 1,79 \pm 0,68 | 1,98 \pm 0,73 | 1,70 \pm 0,90 | 1,60 \pm 0,88 | 1,12 \pm 0,64 |
| | 26 | 2,38 \pm 1,15 | 2,24 \pm 0,82 | 1,96 \pm 0,70 | 2,16 \pm 1,42 | 1,70 \pm 0,96 | 1,67 \pm 1,08 |

V. Discussió

Potencial virulent i activitat inflammatòria associada a *S. pneumoniae* ATCC 51916 en el model experimental.

El disseny d'aquest estudi presentava un repte primerenc: posar a punt un model de meningitis amb un pneumococ amb una CMI a C3G de 16-32 µg/ml. L'absència de treballs que utilitzessin soques amb un grau de resistència tan elevat feia l'estudi més atractiu però alhora anunciava un futur incert.

Els resultats obtinguts en la primera línia d'investigació en animals control inoculats amb dos aïllaments clínics de serotip 23F però amb diferent patró de sensibilitat a β-lactàmics indiquen que l'adquisició de resistència no suposa una pèrdua de virulència per aquests dos pneumococs. Ambdues soques es van mostrar patògenes en el conill assolint concentracions de 10^6 ufc/ml i activant una resposta inflammatòria en el LCR que conjuntament van derivar en una mortalitat d'entre el 30-78% dels animals. Tot i que el nombre de soques incloses en l'estudi és baix, aquesta troballa divergeix dels resultats obtinguts en un model de peritonitis murina en el què de 50 aïllaments clínics de pneumococ amb serogrupos típicament invasius i resistents (9, 14, 19 i 23) cap soca va mostrar virulència (entesa com una Dosi Letal₁₀₀ ≤ 10^5 ufc/ml amb un inòcul intraperitoneal)⁵⁶. Un factor a considerar per a poder explicar aquestes diferències seria el tipus d'infecció pneumocòcica estudiada. La meningitis, com a infecció localitzada, constituiria un bon exemple d'infecció on es podria evidenciar de forma més clara una possible associació entre resistència i virulència ja que l'acció del sistema immune es veuria molt compromesa per un accés limitat a l'espai subaracnoïdal i el pneumococ, independentment de la seva capacitat invasiva, podria multiplicar-s'hi amb facilitat.

Seguint amb aquesta hipòtesi cal remarcar el fet que la soca amb major grau de resistència a C3G presenti una cinètica de creixement més lenta en el temps. El pneumococ resistent aïllat en mostres clíniques demostra tenir *fitness* biològic perquè és capaç de sobreviure com a colonitzador, adquirir multiresistència, disseminar-se i causar malaltia en la població. No obstant, els pocs casos clínics relacionats amb soques amb una CMI > 4 µg/ml¹⁰⁻¹³ fan pensar en que l'adquisició d'un elevat grau de resistència podria dificultar el pas de comensal a patogen. En aquest sentit, el creixement i la virulència retardats en el temps que hem pogut observar per la soca ATCC 51916 en el model animal propiciaria que les defenses de l'hoste poguessin controlar l'avenç de la infecció ja en les primeres

etapes de la patogènia (abans de l'arribada del pneumococ al LCR) de manera que en alguns casos la soca no esdevindria invasiva ni patògena.

Les diferències en la virulència (estudiada com a bacterièmia secundària, activitat inflamatòria i mortalitat final) de les dues soques no estan associades al serotip capsular. En la literatura, la inoculació de fragments de paret cel·lular de diverses soques va produir diferències inflamatòries respecte l'edema cerebral⁵². Per tant, a més a més dels epítops que determinen el serotip, cada soca posseeix unes característiques intrínseques a nivell de composició de LTA/TAs, patró de PBPs o proteïnes de superfície que sumades als factors externs procedents de l'hoste, produeixen un comportament totalment específic en el procés que deriva en una infecció.

La relació entre l'adquisició de resistència a β -lactàmics i la virulència del pneumococ és una qüestió prou complexa per no ser resolta categòricament amb aquest modest estudi. Seran necessaris més treballs experimentals i el coneixement de noves molècules implicades en la patogènia de la infecció pneumocòcica per arribar a resoldre tots els interrogants. La principal troballa d'aquest treball és que posa de manifest que les soques amb elevat grau de resistència són patògenes en el model animal i per tant, ho podrien ser en humans quedant així justificada la necessitat d'estudis d'eficàcia antibiòtica.

Eficàcia terapèutica i resposta inflamatòria dels tractaments empírics recomanats en la meningitis produïda per *S. pneumoniae* ATCC 51916.

Una vegada establerta la patogènia de la soca ATCC 51916, es va prioritzar l'anàlisi del paper de les combinacions empíriques actuals en la meningitis experimental per a posterior comparació amb l'eficàcia de la fosfomicina sola i en combinació.

Com ja hem assenyalat anteriorment, l'èxit d'un tractament antibiòtic en la meningitis pneumocòcica rau en aconseguir una ràpida esterilització del LCR i contribuir el mínim possible a la resposta inflamatòria basal que ja es genera per acció del patogen^{2,72,73}. D'aquesta manera el pronòstic del malalt millora i es redueix el risc de patir seqüeles neurològiques. Per aquest motiu, en els estudis que engloben diferents pautes és tan important l'anàlisi de l'eficàcia com la mesura dels paràmetres inflamatoris.

El primer punt que deriva d'aquest treball i que ha estat comú per a totes les monoteràpies estudiades és que no suposarien una opció terapèutica segura davant d'una soca amb un patró de resistència com el de la soca ATCC 51916. L'eficàcia variable que exhibeixen en el model animal i que ocasiona l'aparició de recreixement bacterià/ fracàs terapèutic es pot relacionar amb causes diverses. D'altra banda, la modulació de la resposta inflamatòria en l'espai subaracnoïdal és clarament significativa només en un dels antimicrobians estudiats.

Malgrat que la resistència a penicil·lina/amoxicil·lina en la soca d'estudi és de grau intermedi, el tractament amb amoxicil·lina 300 mg/kg/6h no ha estat eficaç. L'obtenció d'uns nivells en LCR superiors a la CMI durant tot l'interval de dosificació no ha estat suficient per evitar el recreixement en alguns dels animals i només en el 37,5% dels casos s'ha obtingut l'esterilització del LCR a l'hora 24.

Tenint en compte els nivells de ceftriaxona assolibles en el LCR i la CMI de 32 µg/ml a C3G que presenta aquesta soca, esperàvem que ceftriaxona fos totalment ineficaç¹¹⁷. El pèssim perfil farmacodinàmic obtingut en els experiments de farmacocinètica ($t > CMI = 0$ h) anunciava el fracàs terapèutic que posteriorment s'ha reproduït en alguns conills. En la resta d'animals, amb uns nivells d'antibiòtic en LCR en el mateix rang, ceftriaxona 100 mg/kg/d ha mostrat una activitat bacteriostàtica que podria ser deguda a un efecte subCMI prolongat. En base a les propietats farmacodinàmiques d'aquest antibiòtic, creiem que el nombre de fracassos terapèutics hauria estat superior en experiments de major durada. D'altra banda, com a β-lactàmic esperàvem que provoqués una resposta inflamatòria de gran magnitud però inferior a la dels animals que no han rebut cap tractament¹⁸. La manca d'activitat envers aquesta soca explicaria la presència d'uns paràmetres inflamatoris equivalents als del grup control. En definitiva, ceftriaxona no es pot considerar un tractament eficaç perquè en cap cas ha aconseguit l'esterilització del LCR i perquè la importància de la resposta inflamatòria molt probablement afavoriria l'aparició de seqüeles neurològiques.

Ens els nostres experiments, la variabilitat en la penetració de vancomicina a través de la BHE ha estat el factor determinant de la seva eficàcia tal i com s'ha pogut comprovar en humans⁸⁶ i en altres treballs experimentals^{121,144,155}. En els conills en els què els paràmetres farmacodinàmics AUC/CMB i $t > CMI$ van ser òptims (7/8), vancomicina 15 mg/kg/12h ha estat bactericida i ha aconseguit l'esterilització del LCR. En l'animal restant, l'eficàcia s'ha vist compromesa per una C_{max} en LCR tan sols dues vegades per

sobre la CMI/CMB de la soca ATCC 51916 i pel descens d'aquesta concentració que a l'hora 6 ja se situava per sota dels valors de la CMI/CMB. La seva acció sobre la síntesi del peptidoglicà del pneumococ justificaria l'elevada activitat inflamatòria que ha induït, comparable a la dels animals control i a la dels tractats amb ceftriaxona.

L'activitat antipneumocòcica demostrada per ceftriaxona i vancomicina en monoteràpia en el model experimental es correlaciona amb els resultats de les corbes de letalitat. Ceftriaxona estudiada a concentracions assolibles en LCR no ha inhibït el creixement *in vitro* de la soca ATCC 51916. En canvi, vancomicina ($\geq 0,25 \mu\text{g/ml}$) ha estat bactericida des de l'hora 6 tal i com s'ha descrit en altres estudis davant de pneumococs amb diferents patrons de sensibilitat a β -lactàmics⁹⁰.

El cas de rifampicina és excepcional. En primer lloc, l'efecte bacteriostàtic advertit en les corbes de letalitat (a concentracions de $0,25\text{-}1 \mu\text{g/ml}$) no s'ha correspost amb l'activitat bactericida mostrada en el LCR del conill (amb uns nivells de $0,22 \pm 0,15 \mu\text{g/ml}$). Aquesta discordança en el comportament *in vitro/in vivo* de rifampicina s'ha descrit en altres treballs^{139,142} però no se'n coneix el motiu. En segon lloc, rifampicina en el model animal ha estat capaç d'atenuar la resposta inflamatòria en el LCR essent la reducció estadísticament significativa envers els grups control i ceftriaxona. Aquestes dades confirmen el potencial modulador que rifampicina ha exhibit en diferents models animals de meningitis pneumocòcica¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Tots aquests avantatges confronten amb un obstacle: la facilitat amb què *S. pneumoniae* desenvolupa resistència a rifampicina quan aquesta s'administra en monoteràpia. En aquest treball, l'aparició de mutants resistents ha esdevingut un fet molt freqüent en les corbes de letalitat a llarg termini (24 h), però no s'ha observat en el model animal. De ben segur la utilització de més animals o la prolongació del experiment d'eficàcia hauria posat de manifest algun fracàs terapèutic associat a resistència.

Amb el panorama desfavorable de les monoteràpies, l'estudi de les combinacions antibiòtiques es presentava prometedora des de dos punts de vista. D'una banda esperàvem obtenir una eficàcia millorada respecte als antibiòtics en solitari i de l'altra, reduir el risc de desenvolupament de resistències.

La sinergia demostrada en el model experimental¹²¹ i en el LCR de nens⁸⁷ envers soques resistents a C3G ha propiciat que la combinació de cefotaxima/ceftriaxona més

vancomicina sigui unànimement recomanada pels experts com a tractament empíric de la meningitis pneumocòcica en zones amb una elevada prevalença de soques resistents. Els experiments amb ceftriaxona més vancomicina han evidenciat un efecte additiu *in vitro* ja mostrat en altres treballs^{143,160}. En el model animal, l'addició de vancomicina ha incrementat l'eficàcia respecte les monoteràpies aconseguint l'esterilització del LCR en el 100% dels casos a l'hora 24 i ha conduït a una activitat inflamatòria menor que la observada amb ceftriaxona en solitari. L'augment de l'eficàcia demostrat per la soca ATCC 51916 i que ja s'havia descrit en la meningitis pneumocòcica experimental produïda per soques amb una CMI $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ a C3G^{93,120}, aniria a favor de la recomanació d'aquesta combinació com a tractament empíric independentment del grau de resistència a β -lactàmics. No obstant, la descripció d'almenys un fracàs terapèutic en l'àrea de pediatria¹ no ens permet ser categòrics en les nostres conclusions. A més, l'addició de corticoides a la combinació podria modificar la penetració de vancomicina compromentent la seva eficàcia en adults. Aquests fets han de ser considerats com un missatge que alerta de l'absència d'un tractament universal que compleixi la màxima efectivitat i ens ha d'encoratjar en la recerca de noves alternatives terapèutiques.

La discrepància entre l'escassa activitat *in vitro* i l'efecte bactericida *in vivo* es repeteix quan rifampicina s'estudia en combinació amb ceftriaxona o vancomicina. La indiferència que hem observat en les corbes de letalitat amb rifampicina més ceftriaxona/vancomicina ja s'ha descrit en altres ocasions⁹⁰. En el model animal, ambdues teràpies han aconseguit esterilitzar el LCR en el 100 % dels conills a les 24 h i l'addició de rifampicina ha modulats la resposta inflamatòria basal que es genera amb els dos antibiòtics en monoteràpia. Alguns estudis experimentals han demostrat que l'administració conjunta amb dexametasona no modifica els nivells de rifampicina en LCR pel què aquestes combinacions s'han recomanat com opcions especialment segures en adults si s'afegeixen corticoides^{100,120,144,162}.

La principal limitació que presenten aquestes combinacions rau en el desenvolupament de resistència, fet ben conegut però poc citat, que condiciona la inclusió de rifampicina en el tractament de la meningitis malgrat la bona activitat antipneumocòcica que presenta. En l'associació amb ceftriaxona, es donaria una situació on la cefalosporina actuaria en monoteràpia de manera que la seva activitat es veuria compromesa envers soques resistents a C3G. En la combinació amb vancomicina, el glicopèptid actuaria sol amb la

possibilitat que els nivells fossin erràtics i no es donés una esterilització immediata del LCR.

Per a fer front a aquesta adversitat alguns experts han aconsellat l'ús d'una triple combinació (ceftriaxona més rifampicina més vancomicina)⁸¹. Atès que l'experiència clínica és nul·la, l'única informació disponible és la que deriva del model animal: aquesta triple teràpia no va suposar una millora en l'eficàcia que les combinacions de dos antibiòtics havien exhibit vers una soca amb una CMI a C3G de 4 µg/ml¹²⁰.

En el nostre estudi, la utilització de rifampicina en combinació no ha previngut l'aparició de mutants resistents *in vitro*, però sí que ha manifestat un efecte protector en el model animal. En la literatura, un sol treball en nens mostra que la combinació ceftriaxona més rifampicina va augmentar significativament l'eficàcia respecte les monoteràpies envers dues soques de *S. pneumoniae* resistent⁸⁷. Tanmateix, la curta durada de l'estudi (6 h) no permet valorar un possible efecte protector de la combinació. L'experiència clínica amb rifampicina més vancomicina, més àmplia en nens que en adults^{5,11,86,162}, confirma l'eficàcia i la prevenció de l'aparició de resistència exhibits en el model experimental^{121,144}.

Les combinacions que inclouen rifampicina resulten atractives per la seva eficàcia que no es veu modificada en presència de dexametasona, i per l'efecte atenuant que exerceixen sobre la cascada inflamatòria. Els nostres resultats s'adhereixen a les bones expectatives que altres estudis han generat, però no pretenen extreure conclusions definitives. Fins que no disposem de més sèries clíniques amb idèntics resultats, considerem que un possible augment de la CMI a rifampicina és un aspecte a tenir en compte abans d'incloure rifampicina en el tractament de meningitis per soques resistents.

Eficàcia i influència en els paràmetres inflamatoris de fosfomicina combinada com una alternativa terapèutica en el tractament de la meningitis pneumocòcica produïda per soques resistents a β-lactàmics.

Les primeres notícies sobre l'aplicació de fosfomicina en el tractament de meningitis pneumocòcica es remunten a finals dels anys setanta, quan Sicilia i col·laboradors van publicar una sèrie de dotze casos clínics en els què l'associació entre fosfomicina i un dels tres antibiòtics següents: ampicil·lina, gentamicina o penicil·lina, va aconseguir

l'esterilització del LCR en tots els pacients¹²⁶. L'estudi es basava en l'ampli espectre d'activitat de fosfomicina que inclou la majoria de bacteris causants de meningitis i en l'excel·lent farmacocinètica que la caracteritza i que es tradueix en una unió a proteïnes pràcticament inexistent, un ampli volum de distribució que comprèn una elevada penetració en LCR, i una escassa toxicitat en humans. Més endavant el mateix grup va publicar una nova sèrie de dotze pacients amb meningitis bacteriana en els que la combinació de fosfomicina més ampicil·lina o penicil·lina es va mostrar efectiva¹²⁷.

A finals dels anys 80, dos reculls de 16 i 13 pacients, respectivament, amb meningitis per diversos patògens (entre ells, *S. pneumoniae*), van mostrar l'eficàcia de la combinació fosfomicina més ceftriaxona que va aconseguir l'eradicació del patogen en tots els casos^{135,136}.

Amb uns resultats prometedors, l'interès sobre el potencial terapèutic de la fosfomicina en la meningitis s'ha mantingut intermitent en el temps. L'associació de fosfomicina i β -lactàmic davant de pneumococ resistent a penicil·lina ha estat el focus d'estudi d'alguns treballs que han reproduït *in vitro* l'efecte additiu i la sinergia observats en humans^{127,133,134,171}. D'altra banda, han proliferat alguns estudis experimentals que han valorat positivament l'activitat d'aquesta combinació enfront *S. pneumoniae* amb diferent sensibilitat als β -lactàmics en un model de coàgul de fibrina^{172,173}.

D'entre els pocs estudis de meningitis experimental publicats, destaquem el primer i fins fa poc, únic treball en meningitis pneumocòcica. Nau i col·laboradors¹²⁸ van declinar la utilització de fosfomicina en solitari per la baixa activitat que, a dosis de fins a 160 mg/kg/h (i nivells en LCR de ≈ 350 μ g/ml), va demostrar en el model en conill. D'altra banda, resulta una mica sorprenent que aquests investigadors no esmentin en cap moment el problema de la resistència en el seu refús a l'opció en monoteràpia ja que és un fet ben conegut que s'ha descrit *in vitro*¹⁷⁴.

Quan es comercialitza un antibiòtic comencen les preocupacions pel possible desenvolupament i disseminació de resistència. Des de que la fosfomicina va aparèixer al mercat, han transcorregut més de trenta anys i avui la majoria dels pneumococs segueixen essent sensibles a fosfomicina^{132,175,176}. No obstant, l'ús de fosfomicina en solitari facilita l'adquisició de resistència durant el tractament. Uns valors de CMI ≤ 16 μ g/ml i ≥ 64 μ g/ml són els punts de tall que estableixen que una soca és, respectivament, sensible ó

resistent a fosfomicina¹⁷⁷. L'altra limitació que presenta és l'elevat valor de la CMI del pneumococ a fosfomicina que a més augmenta proporcionalment amb la pèrdua de sensibilitat a penicil·lina. En general les soques que són sensibles a penicil·lina es caracteritzen per una CMI a fosfomicina que oscil·la entre 1 i 8 µg/ml, mentre que les soques resistents tenen una CMI superior d'entre 8 i 64 µg/ml^{126,128,134}.

Amb aquestes premisses, la inclusió de dues soques de *S. pneumoniae* amb diferent patró de resistència a penicil·lina i fosfomicina ens ha permès explorar les diferents possibilitats terapèutiques de la fosfomicina sola i en combinació.

En els nostres experiments, l'aparició de mutants resistents *in vitro* ha esdevingut un fet freqüent per ambdues soques, però en el model animal només s'ha detectat desenvolupament de resistència en la soca HUB 2349. Aquest fet diferencial entre les dues soques *in vivo* respondria al baix nombre d'animals per grup terapèutic més que a un efecte protector de la fosfomicina envers la soca ATCC 51916 tot i que tenir una CMI elevada a fosfomicina podria predisposar a una major facilitat a l'hora d'adquirir resistència.

Respecte a l'activitat, fosfomicina s'ha mostrat eficaç davant de la soca ATCC 51916 (CMI/CMB a fosfomicina: 4/32 µg/ml) essent bactericida en les corbes de letalitat i en el model animal on va aconseguir l'esterilització del LCR en tots els conills. Aquesta gran efectivitat es correspon amb un valor de la C_{max} en LCR vuit vegades per sobre la CMI que alhora reproduïx l'excel·lent penetració antibiòtica a través de la BHE (amb uns valors propers al 50%) anteriorment citada^{126,127,178}. L'activitat davant de la soca HUB 2349 (CMI/CMB a fosfomicina: 16/64 µg/ml) ha estat menor degut a l'aparició de fracassos terapèutics per adquisició de resistència i per uns nivells reduïts en LCR, tan sols dues vegades per sobre la CMI.

Les propietats farmacodinàmiques de la fosfomicina en les infeccions del SNC no es coneixen en profunditat. Alguns autors han suggerit un comportament temps-dependent a partir d'estudis *in vitro* amb *S. aureus*¹²⁹. Les conclusions del nostre estudi indiquen un comportament dependent de concentració tal i com es va suggerir en l'estudi de Nau *et al.* en la meningitis pneumocòcica experimental en el què va ser necessari obtenir una C_{max} de fosfomicina d'almenys deu vegades la CMI de la soca per evidenciar activitat bactericida¹²⁸. Així doncs, dins dels paràmetres que es correlacionen millor amb l'activitat

de fosfomicina en la meningitis pneumocòcica hauríem de considerar la relació C_{\max}/CMI màxima i tenir en compte la CMI del pneumococ com a factor determinant de l'activitat que a més, podria afavorir el desenvolupament de resistència. Amb els nostres resultats creiem que s'haurien de modificar els criteris que estableixen la resistència a fosfomicina per a *S. pneumoniae*, de manera que en infeccions menínigies el punt de tall indicador de resistència fos una $CMI \geq 16 \mu\text{g/ml}$.

D'altra banda, el mecanisme d'acció de fosfomicina a nivell de síntesi de paret cel·lular justifica l'activitat inflamatòria equivalent a l'observada amb els grup control i ceftriaxona.

Confirmades les limitacions de l'ús de fosfomicina en solitari amb els nostres resultats *in vitro/in vivo*, el seu paper en el tractament de la meningitis es centra com a part d'una combinació. L'excel·lent difusió en LCR ja va animar als clínics a utilitzar-la als anys setanta. Posteriorment l'efecte additiu i la sinergia *in vitro* han constituït la millor plataforma per a fomentar els estudis experimentals.

En base a una activitat augmentada envers les monoteràpies, Nau *et al.* van proposar una possible aplicació de fosfomicina en la pràctica clínica com a tractament combinat amb ceftriaxona en casos en què l'ús d'una cefalosporina fracassés¹²⁸. En el nostre treball, la combinació de fosfomicina més ceftriaxona s'ha mostrat bactericida, sinèrgica i amb efecte additiu únicament davant de la soca HUB 2349. L'elevat nivell de resistència a ceftriaxona que caracteritza a la soca ATCC 51916 és el responsable que l'associació fosfomicina més ceftriaxona tingui la mateixa activitat que fosfomicina en solitari. En el model animal, fosfomicina més ceftriaxona ha esdevingut la combinació més eficaç envers les dues soques, amb una activitat superior a l'observada amb el tractament estàndard de ceftriaxona més vancomicina. Fosfomicina més ceftriaxona, amb efecte bactericida des de les 6 h, ha aconseguit esterilitzar el LCR de tots els conills inclosos en l'estudi i reduir els paràmetres inflamatoris.

L'eficàcia de la pauta antibiòtica fosfomicina més vancomicina no ha estat tan estudiada. Només un treball *in vitro* va descriure que l'activitat de vancomicina no es va veure modificada per l'addició de fosfomicina enfront 26 soques de pneumococ resistent a penicil·lina¹⁴³. L'experiència clínica es limita a un cas de meningitis pneumocòcica en adult que no va respondre a un tractament amb cefalosporines de tercera generació i que es

va curar amb vancomicina més fosfomicina¹⁷⁹. L'escassa informació disponible a la literatura fa difícil valorar els nostres bons resultats amb aquest tractament. La sinergia envers la soca HUB 2349 i l'efecte additiu davant de la soca ATCC 51916 observats *in vitro* es correlacionen en el model animal amb una activitat incrementada respecte les monoteràpies enfront de les dues soques. La utilització conjunta d'ambdós esterilitza el LCR de tots els conills i atenua la resposta inflamatòria induïda per les monoteràpies.

L'activitat bactericida de teicoplanina 15 mg/kg/d ha estat confirmada en el nostre model experimental d'acord amb uns paràmetres farmacodinàmics favorables per ambdues soques. Malgrat ser l'antibiòtic amb menor difusió en el LCR dels conills (2,3%), la baixa CMI dels dos pneumococs implicats ha permès assolir un quocient $C_{\max}/CMI > 30$, i mantenir uns nivells d'antibiòtic per sobre de la CMI durant tot l'interval de dosificació. Aquest comportament es correspon amb els resultats *in vitro* en els què teicoplanina a unes concentracions d'entre 0,12 i 0,48 µg/ml s'ha mostrat bactericida. La concordança de les dades es repeteix quan s'estudia la combinació amb fosfomicina que no suposa una millora en l'activitat de la teicoplanina en solitari.

Les tres combinacions amb fosfomicina incloses en aquest treball han complert les dues condicions *sine qua non* per a poder ser considerades com a alternatives en el tractament de la meningitis pneumocòcica: han aconseguit la ràpida esterilització del LCR en el 100% dels casos i han modulats la resposta inflamatòria. A més, han exercit un efecte protector evitant l'emergència *in vivo* de resistència a fosfomicina per ambdues soques.

No obstant, el benefici més destacat que pot aportar una combinació envers les monoteràpies és una major activitat. En base als nostres resultats, l'associació fosfomicina més teicoplanina no es pot tenir en compte com a una opció terapèutica adequada en la meningitis pneumocòcica.

D'altra banda, sí que considerem apropiat recomanar l'addició de fosfomicina a ceftriaxona en pacients en els què el tractament amb la cefalosporina hagi fracassat, en casos d'intolerància a glicopèptids o en pacients amb insuficiència renal. A més, proposem l'addició de fosfomicina a vancomicina com alternativa empírica en pacient al·lèrgic a β-lactàmics. A les nostres interpretacions hem d'afegir dos aspectes positius però no confirmats en aquest estudi. En primer lloc, el fet que ceftriaxona i fosfomicina actuïn sobre la síntesi de la paret cel·lular bacteriana però en etapes diferents reflectiria

l'absència de resistència creuada entre ambdós antimicrobians. I segon, l'adequada penetració de fosfomicina en presència de meninges no inflamades¹⁸⁰ asseguraria una difusió independent de l'ús adjuvant de dexametasona.

Resulta curiós que en l'únic treball de meningitis pneumocòcica experimental publicat s'advertís de la possible competència entre fosfomicina i rifampicina com a acompanyant de la cefalosporina en el tractament de meningitis pneumocòcica causada per una soca resistent ja que en base als nostres resultats hem pogut observar certs paral·lelismes en el comportament d'ambdós antimicrobians¹²⁸. Com ha succeït amb rifampicina, la utilització de fosfomicina en combinació ha evitat el desenvolupament de resistència en el model animal però no en les corbes de letalitat. Aquest fet limitarà l'aplicació directa de les combinacions de fosfomicina de la mateixa manera que ocorre amb les combinacions amb rifampicina. No obstant, la manca de casos en els que s'hagi descrit aparició de resistència durant el tractament combinat amb fosfomicina sumada a la bona activitat que aquestes pautes han demostrat en el model experimental reforça les nostres conclusions de considerar-les com a opcions terapèutiques en el tractament de meningitis pneumocòcica deguda a soques resistents.

VI. Conclusions Finals

1. Les dues soques de *S. pneumoniae* amb serotip 23F incloses en aquest estudi han demostrat la seva patogenicitat en ser capaces d'induir meningitis en el model animal. Per tant, l'adquisició de resistència no ha suposat pèrdua de virulència en cap dels dos aïllaments.
2. En el model de meningitis experimental, les dues soques han presentat diferències respecte la virulència i respecte la corba de creixement en el LCR de conills. Aquestes divergències no estan associades al serotip capsular.
3. L'aparició de fracassos terapèutics i el desenvolupament de resistència desaconsellen l'ús de ceftriaxona, fosfomicina, rifampicina i vancomicina en solitari en el tractament de la meningitis pneumocòcica deguda a soques resistents a cefalosporines de tercera generació.
4. Les combinacions ceftriaxona més vancomicina, ceftriaxona més rifampicina i vancomicina més rifampicina s'han revelat com a tractaments eficaços en la meningitis pneumocòcica per una soca amb un grau elevat de resistència a cefalosporines de tercera generació, tant per la millora de l'eficàcia com per l'atenuació de la resposta inflamatòria en el LCR respecte a les monoteràpies.
5. Els nostres resultats amb ceftriaxona més vancomicina i vancomicina més rifampicina reforcen les recomanacions dels experts en el tractament empíric de la meningitis pneumocòcica, i proporcionen una base experimental per a que aquestes recomanacions s'apliquin sigui quin sigui el nivell de resistència a β -lactàmics.
6. La fosfomicina amb una elevada penetració a través de la barrera hematoencefàlica, activa davant de pneumococ i amb una baixa toxicitat, pot ser un bon candidat en el tractament combinat de la meningitis pneumocòcica.

7. Els punts de tall que defineixen la sensibilitat de *S. pneumoniae* a fosfomicina no són adequats en la infecció meníngia. Caldria establir una CMI ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ com a nou punt indicador de resistència.
8. La combinació fosfomicina més ceftriaxona estaria especialment indicada en pacients amb intolerància a glicopèptids o amb insuficiència renal.
9. La combinació fosfomicina més vancomicina pot constituir una opció terapèutica en pacients al·lèrgics a β -lactàmics.

VII. Bibliografia

1. Arditi M, Mason EO Jr, Bradley JS, Tan TQ, Barson WJ, *et al.* 1998. Three-year multicenter surveillance of pneumococcal meningitis in children: clinical characteristics, and outcome related to penicillin susceptibility and dexamethasone use. *Pediatrics* 102: 1087-97.
2. Kastenbauer S, Pfister HW. 2003. Pneumococcal meningitis in adults spectrum of complications and prognosis factors in a series of 87 cases. *Brain* 126: 1015-25.
3. Weisfelt M, van de Beek D, Spanjaard L, Reitsma JB, de Gans J. 2006. Clinical features, complications, and outcome in adults with pneumococcal meningitis: a prospective case series. *Lancet Neurol.* 5: 123–9.
4. Viladrich PF, Cabellos C, Pallares R, Tubau F, Martínez-Lacasa J, *et al.* 1996. High doses of cefotaxime in the treatment of adults meningitis due to *S. pneumoniae* with decreased susceptibilities to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 40: 218-20.
5. John CC. 1994. Treatment failure with use of a third-generation cephalosporin for penicillin-resistant pneumococcal meningitis: case report and review. *Clin Infect Dis.* 18: 188-93.
6. Catalán MJ, Fernández JM, Vázquez A, Varela de Seijas E, Suárez A, *et al.* 1994. Failure of cefotaxime in the treatment of meningitis due to relatively resistant *S. pneumoniae*. *Clin Infect Dis.* 18: 766-9.
7. Brett MS. 2001. Emergence of a high-level cefotaxime-resistant *Streptococcus pneumoniae* strain in New Zealand. *J Med Microbiol.* 50: 173-6.
8. Casal J. 1982. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*; serotype distribution of penicillin-resistant strains in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 22: 222-5.
9. Fenoll A, Jado Y, Vicioso D, Pérez A, Casal J. 1998. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antibiotic resistance in Spain: update (1990-1996). *J Clin Microbiol.* 36: 3447-54.
10. Sloas MM, Barrett FF, Chesney PJ, English BK, Hill BC, *et al.* 1992. Cephalosporin treatment failure in penicillin- and cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *Pediatr Infect Dis J.* 11: 662-6.
11. Leggiadro, RJ, Barrett FF, Chesney PJ, Davis I, Tenover FC. 1994. Invasive pneumococci with high level penicillin and cephalosporin resistance at a mid-south children's hospital". *Pediatr Infect Dis J.* 13: 320-2.

12. Ruiz J, Sempere M, Simarro E, Fenoll A. 1998. Description of two new isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Spain that are highly resistant to cefotaxime. *Antimicrob Agents Chemother.* 42: 2768-9.
13. Ulloa-Gutierrez R, Avila-Aguero ML, Herrera ML, Herrera JF, Vargas A, *et al.* 2003. Highly-resistant *Streptococcus pneumoniae* meningitis in Central America. *An Pediatr (Barc)* 58:396-7.
14. Valeria Prado J. 2001. Conceptos microbiológicos de *Streptococcus pneumoniae*. *Rev Chil Infect.* 18 (Supl.1): 6-9.
15. Tuomanen E, Austrian R, Masure HR. 1995. Pathogenesis of pneumococcal meningitis. *New Engl J Med.* 332: 1280-4.
16. Knecht JC, Schiffman G, Austrian R. 1970. Some biological properties of pneumococcus type 37 and the chemistry of its capsular polysaccharide. *J Exp Med.* 132: 475-87.
17. Kostyukova NN, Volkova MO, Ivanova VV, Kvetnaya AS. 1995. A study of pathogenic factors of *Streptococcus pneumoniae* strains causing meningitis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 10: 133-7.
18. Tuomanen E, Liu H, Hengstler B, Zak O, Tomasz A. 1985. The induction of meningeal inflammation by components of pneumococcal cell wall. *J Infect Dis.* 151: 859-68.
19. Stuertz K, Schmidt H, Eiffert H, Schwartz P, Mäder M, *et al.* 1998. Differential release of lipoteichoic and teichoic acids from *Streptococcus pneumoniae* as a result of exposure to β -lactam antibiotics, rifamycins, trovafloxacin, and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrob Agents Chemother.* 42: 277-81.
20. Murray, PR, Kobayashi y col. *Microbiología Médica.* 4ª. Ed., Mosby, Elsevier Madrid, 2002.
21. Enright MC, Spratt BG. 1999. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol.* 7: 482-7.
22. Vázquez JA, Berron S. 2004. Multilocus sequence typing: el marcador molecular en la era de Internet. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 22: 113-20.
23. Coffey TJ. 1998. Recombinational exchanges at the capsular polysaccharide biosynthetic locus lead to frequent serotype changes among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 27: 73-83.
24. Zigelboim S, Tomasz A. 1980. Penicillin-binding proteins of multiply antibiotic-resistant South African strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 17: 434-42.

25. Hakenbeck R, Ellerbrok H, Briese T, Handwerger S, Tomasz A. 1986. Penicillin-binding proteins of penicillin-susceptible and -resistant pneumococci: immunological relatedness of altered proteins and changes in peptides carrying the beta-lactam binding site. *Antimicrob Agents Chemother.* 30: 553-8.
26. Dowson CG, Hutchison A, Brannigan JA, George RC, Hansman D, *et al.* 1989. Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 8842-6.
27. Coffey TJ, Dowson CG, Daniels M, Spratt BG. 1993. Horizontal spread of an altered penicillin-binding protein 2B gene between *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis*. *FEMS Microbiol Lett.* 110: 335-9.
28. Hakenbeck R, König A, Kern I, van der Linden M, Keck W, *et al.* 1998. Acquisition of five high-MR penicillin-binding protein variants during transfer of high-level beta-lactam resistance from *Streptococcus mitis* to *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 180: 1831-40.
29. Barcus VA, Ghanekar K, Yeo M, Coffey TJ, Dowson CG. 1995. Genetics of high level penicillin resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett.* 126: 299-303.
30. Smith AM, Klugman KP. 1998. Alterations in PBP 1A essential for high-level penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 42: 1329-33.
31. Hansman D, Bullen MM. 1967. A resistant pneumococcus. *The Lancet*, 2, 264-265.
32. Hansman D, Glasgow H, Sturt J, Devitt L, Douglas R. 1971. Increased resistance to penicillin of pneumococcal isolated from man. *N Engl J Med.* 284: 175-7.
33. Jacobs MR, Koornhof HJ, Robins-Browne RM, Stevenson CM, Vermaak ZA, *et al.* 1978. Emergence of multiply resistant pneumococci *N Engl J Med.* 299: 735-40.
34. Appelbaum PC. 1987. World-wide development of antibiotic resistance in pneumococci. *Eur J Clin Microbiol.* 6:367-77.
35. Muñoz R, Coffey TJ, Daniels M, Dowson CG, Laible G, *et al.* 1991. Intercontinental spread of a multiresistant clone of serotype 23F *Streptococcus pneumoniae* *J Infect Dis.* 164: 302-6.
36. Tomasz A. 1997. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis.* 24: S85-S88.

37. Pérez-Trallero E, García de la Fuente C, García-Rey C, Baquero F, Aguilar L, *et al.* 2005. Geographical and ecological analysis of resistance, coresistance and coupled resistance to antimicrobials in respiratory pathogenic bacteria in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 1965-72.
38. Fenoll A, Asensio G, Jado I, Berron S, Camacho MT, *et al.* 2002. Antimicrobial susceptibility and pneumococcal serotypes. *J Antimicrob Chemother.* 50 (Suppl. S2): 13-9.
39. Oteo J, Lazaro E, de Abajo FJ, Baquero F, Campos J; Spanish Members of the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. 2004. Trends in Antimicrobial Resistance in 1,968 Invasive *Streptococcus pneumoniae* Strains Isolated in Spanish Hospitals (2001 to 2003): Decreasing Penicillin Resistance in Children's Isolates. *J Clin Microbiol.* 42: 5571-7.
40. Bruinsma N, Kristinsson KG, Bronzwaer S, Schrijnemakers P, Degener J, *et al*; European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). 2004. Trends of penicillin and erythromycin resistance among invasive *Streptococcus pneumoniae* in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 54: 1045-50.
41. Muñoz R, Dowson CG, Daniels M, Coffey TJ, Martin C, *et al.* 1992. Genetics of resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 6: 2461-5.
42. Coffey TJ, Daniels M, McDougal LK, Dowson CG, Tenover FC, Spratt BG. 1995. Genetic analysis of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with high-level resistance to expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 39: 1306-13.
43. Liñares J, Pallarés R, Alonso T, Pérez JL, Ayats J, *et al.* 1992. Trends in antimicrobial resistance of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Bellvitge Hospital, Barcelona, Spain (1979-1990). *Clin Infect Dis.* 15: 99-105.
44. Liñares J, Tubau F. 1998. Resistencia a cefalosporinas en infecciones por *Streptococcus pneumoniae*. *Med Clin.* 110 (Suppl.1): 21-24.
45. Reinert RR, Reinert S, van der Linden M, Cil MY, Al-Lahham A, Appelbaum P. 2005. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in eight European countries from 2001 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 2903-13.
46. Ferrandiz MJ, Ardanuy C, Linares J, Garcia-Arenzana JM, Cercenado E, *et al*; Spanish Pneumococcal Infection Study Network. 2005. New mutations and horizontal transfer of

- rpoB among rifampin-resistant *Streptococcus pneumoniae* from our Spanish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 2237-45.
47. Musher DM. 2000. *Streptococcus pneumoniae*, p. 2128-2147. In G. L. Mandell, J. E. Bennett, and R. Dolin (ed.), *Principles and practice of infectious diseases*, vol. 2. Churchill Livingstone, Philadelphia, Pa.
 48. Gray BM, Converse GM 3rd, Dillon HC Jr. 1980. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. *J Infect Dis.* 142: 923-33.
 49. Enright MC, Fenoll A, Griffiths D, Spratt BG. 1999. The three major Spanish clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* are the most common clones recovered in recent cases of meningitis in Spain. *J Clin Microbiol.* 37: 3210-16.
 50. Ostergaard C, Brandt C, Konradsen HB, Samuelsson S. 2004. Differences in survival, brain damage, cerebrospinal fluid cytokine kinetics due to meningitis caused by 3 different *Streptococcus pneumoniae* serotypes: evaluation in humans and in 2 experimental models. *J Infect Dis.* 190: 1212-20.
 51. Henriques B, Kalin M, Ortqvist A, Olsson Liljequist B, Almela M, *et al.* 2000. Molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in 5 countries. *J Infect Dis.* 182: 833-9.
 52. Tauber MG, Burroughs M, Niemoller UM, Kuster H, Borschberg U, *et al.* 1991. Differences of pathophysiology in experimental meningitis caused by three strains of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis.* 163:806-11.
 53. Engelhard D, Pomeranz S, Gallily R, Strauss N, Tuomanen E. 1997. Serotype-related differences in inflammatory response to *Streptococcus pneumoniae* in experimental meningitis. *J Infect Dis.* 175: 979-82.
 54. Fernández A, Cabellos C, Tubau F, Liñares J, Viladrich PF, *et al.* 2001. Relationship between penicillin and cephalosporin resistance of *Streptococcus pneumoniae* strains and its inflammatory activity in the experimental model of meningitis. *Med Microbiol Immunol (Berl).* 190:135-8.
 55. Bedos JP, Chevret S, Chastang C, Geslin P, Regnier B. 1996. Epidemiologic features of and risk factors for infection by *Streptococcus pneumoniae* strains with diminished susceptibility to penicillin: findings of a French survey. *Clin Infect Dis.* 22: 63-72.

56. Azoulay-Dupuis E, Rieux V, Muffat-Joly M, Bedos JP, Vallee E, *et al.* 2000. Relationship between capsular type, penicillin susceptibility, and virulence of human *Streptococcus pneumoniae* isolates in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 44: 1575-7.
57. Rieux V, Carbon C, Azoulay-Dupuis E. 2001. Complex relationship between acquisition of beta-lactam resistance and loss of virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis.* 184: 66-72.
58. McIntyre PB, Macintyre CR, Gilmour R, Wang H. 2005. A population based study of the impact of corticosteroid therapy and delayed diagnosis on the outcome of childhood pneumococcal meningitis. *Arch Dis Child.* 90: 391-6.
59. Schneider O, Michel U, Zysk G, Dubuis O, Nau R. 1999. Clinical outcome in pneumococcal meningitis correlates with CSF lipoteichoic acid concentrations. *Neurology* 53: 1584-7.
60. Quagliarello VJ, Scheld WM. 1997. Treatment of bacterial meningitis. *N Engl J Med.* 336: 708-16.
61. Peltola H. 2000. 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.* 13: 302-17.
62. Garau, J, Martínez-Lacasa J. 2003. Resistencia de *Streptococcus pneumoniae* a los betalactámicos y manejo de la meningitis neumocócica. *Emferm Infec Microbiol Clin.* 21: 3-6.
63. Casado Flores J, Fenoll A, Aristegui Fernandez J, Rodrigo De Liria C, Martínón 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. 2002. *An Esp Pediatr.* 57: 295-300.
64. Domínguez A, Salleras L, Cardenosa N, Ciruela P, Carmona G, *et al.* 2002. The epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* disease in Catalonia (Spain). A hospital-based study. *Vaccine* 26: 2989-94.
65. Casado Flores J, Aristegui J, Rodrigo de Liria C, Martínón JM, Fernández Pérez C. 2002. Prevalencia de meningitis neumocócica en niños españoles. *An Esp Pediatr.* 56: 5-9.
66. Pineda V, Fontanals D, Larramona H, Domingo M, Anton J, *et al.* 2002. Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in children in an area of Barcelona, Spain. *Acta Paediatr.* 91: 1251-6.

67. Venetz I, Schopfer K, Muhlemann K. 1998. Paediatric, invasive pneumococcal disease in Switzerland, 1985–1994. Swiss Pneumococcal Study Group. *Int J Epidemiol.* 27: 1101-4.
68. Von Kries R, Siedler A, Schmitt HJ, Reinert RR. 2000. Proportion of invasive pneumococcal infections in German children preventable by pneumococcal conjugate vaccines. *Clin Infect Dis.* 31:482-7.
69. Strutton DR, Stang P. 2003. Prophylaxis against respiratory syncytial virus (RSV), varicella, and pneumococcal infections: Economic-based decision-making. *J Pediatr.* 143: S157-62.
70. Sleeman K, Knox K, George R, Miller E, Waight P, *et al*; Public Health Laboratory Service; Oxford Pneumococcal Surveillance Group. 2001. Invasive pneumococcal disease in England and Wales: vaccination implications. *J Infect Dis.* 183: 239-46.
71. Goetghebuer T, West TE, Wermenbol V, Cadbury AL, Milligan P, *et al.* 2000. Outcome of meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type b in children in The Gambia. *Trop Med Int Health* 5: 207-13.
72. McAllister CK, O'Donoghue JM, Beaty HN. 1975. Experimental pneumococcal meningitis. II. Characterization and quantitation of the inflammatory process. *J Infect Dis.* 132: 355-60.
73. Lebel MH, McCracken GH Jr. 1989. Delayed cerebrospinal fluid sterilization and adverse outcome of bacterial meningitis in infants and children. *Pediatrics* 83: 161-7.
74. Tunkel AR, Scheld WS. 1993. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev.* 6: 118-36.
75. Koedel U, Scheld WM, Pfister HW. 2002. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *The Lancet Infect Dis.* 2: 721-36.
76. Lutsar I, McCracken GH Jr, Friedland IR. 1998. Antibiotic pharmacodynamics in cerebrospinal fluid. *Clin Infect Dis.* 27: 1117-27.
77. Guillemot D, Carbon C, Balkau B, Geslin P, Lecoer H, *et al.* 1998. Low dosage and long treatment duration of beta-lactam: risk factors for carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *JAMA* 279: 365-70
78. Knudsen JD, Odenholt I, Erlendsdottir H, Gottfredsson M, Cars O, *et al.* 2003. Selection of resistant *Streptococcus pneumoniae* during penicillin treatment *in vitro* and in three animal models. *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 2499-2506.

79. Andes D, Craig WA. 2002. Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review. *Int J Antimicrob Agents* 19: 261-8.
80. Paris MM, Ramilo O, McCracken GH Jr. 1995. Management of meningitis caused by penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 39: 2171-5.
81. American Academy of Pediatrics, Committee of Infectious Diseases. 1997. Therapy for children with invasive pneumococcal infections. *Pediatrics* 99: 289-99.
82. Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, Kaufman BA, Roos KL, *et al.* 2004. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis.* 39: 1267-84.
83. Friedland IR, Klugman KP. 1992. Failure of chloramphenicol therapy in penicillin-resistant pneumococcal meningitis. *Lancet* 339: 405-8.
84. Viladrich PF, Gudiol F, Liñares J, Rufi G, Ariza J, *et al.* 1988. Characteristics and antibiotic therapy of adult meningitis due to penicillin-resistant pneumococci. *Am J Med.* 84: 839-46.
85. Friedland IR, Klugman KP. 1997. Cerebrospinal fluid bactericidal activity against cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in children with meningitis related with high-dosage cefotaxime. *Antimicrob Agents Chemother.* 41: 1888-91.
86. Viladrich PF, Gudiol F, Liñares J, Rufi G, Ariza J, *et al.* 1991. Evaluation of vancomycin in the therapy of adult pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 35: 2467-72.
87. Klugman KP, Friedland IR, Bradleym JS. 1995. Bactericidal activity against cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in cerebrospinal fluid of children with acute bacterial meningitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 39: 1988-92.
88. Kleiman MD, Weinberg GA, Reynolds JK, Allen SD. 1993. Meningitis with beta-lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*: the need for early repeat lumbar puncture. *Pediatr Infect Dis J.* 12: 782-4.
89. Wong VK, Wright HT Jr, Ross LA, Mason WH, Inderlied CB, *et al.* 1991. Imipenem-cilastatin treatment of bacterial meningitis in children. *Pediatr Infect Dis J.* 10: 122-5.
90. Barakett V, Lesage D, Delisle F, Vergez P, Petit JC. 1993. Killing kinetics of vancomycin and rifampin tested alone and in combination against penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 12: 69-71.

91. Gerber CM, Cottagnoud M, Neftel KA, Tauber 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: 866–70.
92. Cottagnoud P, Cottagnoud M, Acosta F, Flatz L, Kühn F, *et al.* 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: 656-62.
93. Kim SW, Jin JH, Kang SJ, Jung SI, Kim YS, *et al.* 2004. Therapeutic efficacy of meropenem for treatment of experimental penicillin-resistant pneumococcal meningitis. *J Korean Med Sci.* 19: 21-6.
94. Cottagnoud P, Pfister M, Cottagnoud M, Acosta F, Tauber MG. 2003. Activities of ertapenem, a new long-acting carbapenem, against penicillin-sensitive or -resistant pneumococci in experimental meningitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 47:1943-7.
95. Rodriguez-Cerrato V, Ghaffar F, Saavedra J, Michelow IC, Hardy RD, *et al.* 2001. BMS-284756 in experimental cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 45: 3098-3103.
96. Lutsar I, Friedland IR, Wubbel L, McCoig CC, Jafri HS, *et al.* 1988. Pharmacodynamics of gatifloxacin in cerebrospinal fluid in experimental cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 42: 2650-5.
97. Ostergaard C, Sorensen TK, Knudsen JD, Frimodt-Moller N. 1998. Evaluation of moxifloxacin, a new 8-methoxyquinolone, for treatment of meningitis caused by a penicillin-resistant pneumococcus in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother.* 42: 1706-12.
98. Paris MM, Hickey SM, Trujillo M, Shelton S, McCracken GH Jr. 1995. Evaluation of CP-99,219, a new fluoroquinolone, for treatment of experimental penicillin- and cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 39: 1243-6.
99. Tauber MG, Khayam-Bashi H, Sande MA. 1985. Effects of ampicillin and corticosteroids on brain water content, cerebrospinal fluid pressure, and cerebrospinal fluid lactate levels in experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis.* 151: 528-34.
100. Paris MM, Hickey SM, Uscher MI, Shelton S, Olsen KD, McCracken GH Jr. 1994. Effect of dexamethasone on therapy of experimental penicillin- and cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 38: 1320-4.

101. Martos A, Cabellos C, Martínez-Lacasa J, Viladrich PF, Gudiol F. 1995. Protective effect of dexamethasone and phenytoin in the treatment of experimental pneumococcal meningitis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 13:146-50.
102. McIntyre PB, Berkey CS, King SM, Schaad UB, Kilpi T, *et al.* 1997. Dexamethasone as adjunctive therapy in bacterial meningitis: a meta-analysis of randomized clinical trials since 1988. *JAMA* 278: 925-31.
103. Weisfelt M, van de Beek D, de Gans J. 2006. Dexamethasone treatment in adults with pneumococcal meningitis: risk factors for death. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 10:1-6.
104. De Gans J, van de Beek D. 2002. Dexamethasone in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med*. 347: 1549-56.
105. Van de Beek D, de Gans J. 2004. Dexamethasone and pneumococcal meningitis, *Ann Intern Med*. 141: 327.
106. Zysk G, Brück W, Gerber J, Brück Y, Prange HW *et al.* 1996. Anti-inflammatory treatment influences neuronal apoptotic cell death in the dentate gyrus in experimental pneumococcal meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 55: 722-8.
107. Leib SL, Heimgartner C, Bifare YD, Loeffler JM, Tauber MG. 2003. Dexamethasone aggravates hippocampal apoptosis and learning deficiency in pneumococcal meningitis in infant rats. *Pediatr Res*. 54: 353–7.
108. Cabellos C, Martínez-Lacasa J, Martos A, Tubau F, Fernández A, *et al.* 1995. Influence of dexamethasone on efficacy of ceftriaxone and vancomycin therapy in experimental pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother*. 39: 2158-60.
109. Koedel U, Pfister HW. 1997. Protective effect of the antioxidant N-acetyl-L-cysteine in pneumococcal meningitis in the rat. *Neurosci Lett*. 225: 33–6.
110. Auer M, Pfister LA, Leppert D, Tauber MG, Leib SL. 2000. Effects of clinically used antioxidants in experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis*. 182: 347–50.
111. Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen, 1959.
112. Zwijnenburg PJ, van der Poll T, Florquin S, van Deventer SJ, Roord JJ, *et al.* 2001. Experimental pneumococcal meningitis in mice: a model of intranasal infection. *J Infect Dis*. 183: 1143-6.

113. Moxon ER, Goldthorn JF, Schwartz AD. 1980. *Haemophilus influenzae* b infection in rats: effect of splenectomy on bloodstream and meningeal invasion after intravenous and intranasal inoculations. *Infect Immun.* 27: 872-5.
114. Rodríguez AF, Kaplan SL, Hawkins EP, Mason EO Jr. 1991. Hematogenous pneumococcal meningitis in the infant rat: description of a model. *J Infect Dis.* 164: 1207-9.
115. Dacey RG, Sande MA. 1974. Effect of probenecid on cerebrospinal fluid concentrations of penicillin and cephalosporin derivatives. *Antimicrob Agents Chemother.* 6: 437-41.
116. Nau R, Prange HW, Muth P, Mahr G, Menck S, *et al.* 1993. Passage of cefotaxime and ceftriaxone into the cerebrospinal fluid of patients with uninflamed meninges. *Antimicrob Agents Chemother.* 37: 1518-24.
117. Lutsar I, Ahmed A, Friedland IR, Trujillo M, Wubbel L, *et al.* 1997. Pharmacodynamics and bactericidal activity of ceftriaxone therapy in experimental cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 41: 2414-7.
118. Lutsar I, Friedland IR. 2000. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cephalosporins in cerebrospinal fluid. *Clin Pharmacokinet.* 39: 335-43.
119. Latif R, Dajani AS. 1983. Ceftriaxone diffusion into cerebrospinal fluid of children with meningitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 23: 46-8.
120. Lee H, Song JH, Kim SW, Oh WS, Jung SI, *et al.* 2004. Evaluation of a triple-drug combination for treatment of experimental multidrug-resistant pneumococcal meningitis. *Int J Antimicrob Agents* 23:307-10.
121. Friedland IR, Paris MM, Ehrett S, Hickey SM, Olsen KD, *et al.* 1993. Evaluation of antimicrobial regimens for treatment of experimental penicillin- and cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 37: 1630-6.
122. Frimodt-Moller N, Bentzon MW, Thomsen VF. 1986. Experimental infection with *Streptococcus pneumoniae* in mice: correlation of *in vitro* activity and pharmacokinetic parameters with *in vivo* effect for 14 cephalosporins. *J Infect Dis.* 154: 511-7.
123. Craig WA. 1995. Interrelation between pharmacokinetics and pharmacodynamics in determining dosage regimens for broad-spectrum cephalosporins. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 22: 89-96.
124. Cabellos C, Viladrich PF, Verdaguer R, Pallares R, Liñares J, *et al.* 1995. A single daily dose of ceftriaxone for bacterial meningitis in adults: experience with 84 patients and review of the literature. *Clin Infect Dis.* 20:1164-8.

125. Cabellos C, Martínez-Lacasa J, Tubau F, Fernández A, Viladrich PF, *et al.* 2000. Evaluation of combined ceftriaxone and dexamethasone therapy in experimental cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis. *J Antimicrob Chemother.* 45: 315-20.
126. Sicilia T, Fadon A, Rodriguez A, Soto J. 1977. Fosfomicin in pneumococcal meningitis. *Chemotherapy* 23 Suppl 1: 429-40.
127. Sicilia T, Estevez E, Rodriguez A. 1981. Fosfomicin penetration into the cerebrospinal fluid of patients with bacterial meningitis. *Chemotherapy* 27: 405-13.
128. Nau R, Zysk G, Reinert RR, Mergeryan H, Eiffert H, *et al.* 1995. Activity of fosfomicin in a rabbit model of experimental pneumococcal meningitis. *J Antimicrob Chemother.* 36: 997-1004.
129. Pfausler B, Spiss H, Dittrich P, Zeitlinger M, Schmutzhard E, *et al.* 2004. Concentrations of fosfomicin in the cerebrospinal fluid of neurointensive care patients with ventriculostomy-associated ventriculitis. *J Antimicrob Chemother.* 53: 848-52.
130. Legat FJ, Maier A, Dittrich P, Zenahlik P, Kern T, *et al.* 2003. Penetration of fosfomicin into inflammatory lesions in patients with cellulitis or diabetic foot syndrome. *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 371-4.
131. Joukhadar C, Klein N, Dittrich P, Zeitlinger M, Geppert A, *et al.* 2003. Target site penetration of fosfomicin in critically ill patients. *J Antimicrob Chemother.* 51: 1247-52.
132. Chayakul, P, Hortiwakul R. 2004. *In vitro* activities of penicillin G, cefotaxime, fosfomicin, fusidic acid and vancomycin against *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis Antimicrob Agents* 21: 41-6.
133. Barakett V, Lesage D, Delisle F, Burghoffer B, Richard G, *et al.* 1993. Synergy of cefotaxime and fosfomicin against penicillin-resistant pneumococci. *J Antimicrob Chemother.* 31: 105-9.
134. Bañón Arias R, García López M, Pinedo Sánchez A. 2001. Time-kill evaluation of antimicrobial regimens against clinical isolates of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *J Chemother.* 13: 535-40.
135. Stahl JP, Croize J, Baud A, Bru JP, de Rougemont P, *et al.* 1986. Treatment of neurosurgical bacterial meningitis using the combination of ceftriaxone-fosfomicin. *Pathol Biol. (Paris)* 34: 479-82.
136. May T, Weber M, Gerard A, Schmit JL, Voiriot P, *et al.* 1987. Treatment of post-traumatic and post-neurosurgical bacterial meningitis with ceftriaxone alone or in combination with fosfomicin. *Pathol Biol. (Paris)* 35 :839-42.

137. Portier H, Armengaud M, Becq-Giraudon B, Bousser J, Desbordes JM, *et al.* 1987. Treatment with a cefotaxime-fosfomicin combination of staphylococcal or enterobacterial meningitis in adults. *Presse Med.* 16: 2161-6.
138. Nau R, Prange HW, Menck S, Kolenda H, Visser K, *et al.* 1992. Penetration of rifampicin into the cerebrospinal fluid of adults with uninflamed meninges. *J Antimicrob Chemother.* 29: 719-24.
139. Nau R, Kaye K, Sachdeva M, Sande ER, Tauber MG. 1994. Rifampin for therapy of experimental pneumococcal meningitis in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother.* 38: 1186-9.
140. Long MW, Snider DE Jr, Farer LS. 1979. U.S. Public Health Service Cooperative trial of three rifampin-isoniazid regimens in treatment of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 119: 879-94.
141. Mahajan M, Rohatgi D, Talwar V, Patni SK, Mahajan P, *et al.* 1997. Serum and cerebrospinal fluid concentrations of rifampicin at two dose levels in children with tuberculous meningitis. *J Commun Dis.* 29:269-74.
142. Tubau F, Cabellos C, Liñares J. 1996. Lack of correlation between in vitro and in vivo studies of combinations of rifampin plus vancomycin or β -lactam antibiotics against *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 40: 1573-4.
143. Doit CP, Bonacorsi SP, Fremaux AJ, Sissia G, Cohen R, *et al.* 1994. *In vitro* activities of antibiotics at clinically achievable concentrations in cerebrospinal fluid against penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* isolated from children with meningitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 38: 2655-9.
144. Martínez-Lacasa J, Cabellos C, Martos A, Fernández A, Tubau F, *et al.* 2002. Experimental study on the efficacy of vancomycin, rifampin and dexamethasone in the therapy of pneumococcal meningitis. *J Antimicrob Chemother.* 49: 507-13.
145. van Tilburg PM, Bogaert D, Sluijter M, Jansz AR, de Groot R, *et al.* 2001. Emergence of rifampin-resistant *Streptococcus pneumoniae* as a result of antimicrobial therapy for penicillin-resistant strains. *Clin Infect Dis.* 33: e93-6.
146. Meier PS, Utz S, Aebi S, Muhlemann K. 2003. Low-level resistance to rifampin in *Streptococcus pneumoniae* *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 863-8.
147. Nau R, Wellmer A, Soto A, Koch K, Schneider O, *et al.* 1997. Rifampin reduces early mortality in experimental *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *J Infect Dis.* 179: 1557-60.

148. Bottcher T, Gerber J, Wellmer A, Smirnov AV, Fakhrjanali F, *et al.* 2000. Rifampin reduces production of reactive oxygen species of CSF phagocytes and hippocampal neuronal apoptosis in experimental *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *J Infect Dis.* 181: 2095-8.
149. Gerber J, Eiffert H, Fleischer H, Wellmer A, Munzel U, *et al.* 2001. Reduced release of DNA from *Streptococcus pneumoniae* after treatment with rifampin in comparison to spontaneous growth and ceftriaxone treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 20: 490-3.
150. Cobo J. Vancomicina y teicoplanina: aspectos diferenciales. 1995. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 13: 600-10.
151. Knudsen JD, Fuursted K, Raber S, Espersen F, Frimodt-Moller N. 2000. Pharmacodynamics of glycopeptides in the mouse peritonitis model of *Streptococcus pneumoniae* or *Staphylococcus aureus* infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 4: 1247-54.
152. Stahl JP, Croize J, Wolff M, Garaud JJ, Leclercq P, Vachon F, Micoud M. 1987. Poor penetration of teicoplanin into cerebrospinal fluid in patients with bacterial meningitis. *J Antimicrob Chemother.* 20: 141-2.
153. Fernandez A, Cabellos C, Tubau F, Maiques JM, Domenech A, *et al.* 2005. Experimental study of teicoplanin, alone and in combination, in the therapy of cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis. *J Antimicrob Chemother.* 55: 78-83.
154. Goldstein FW, Geslin P, Acar JF. 1994. Comparative activity of teicoplanin and vancomycin against 400 penicillin susceptible and resistant *Streptococcus pneumoniae*. The French Study Group. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 13: 33-4.
155. Ahmed A, Jafri H, Lutsar I, McCoig CC, Trujillo M, *et al.* 1999. Pharmacodynamics of vancomycin for the treatment of experimental penicillin- and cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 43: 876-81.
156. Ahmed A. 1997. A critical evaluation of vancomycin for treatment of bacterial meningitis. *Pediatr Infect Dis J.* 16: 85-903.
157. Steinberg T, Rachmel A, Samra Z, Ashkenazi S. 1997. Penicillin-resistant pneumococcal meningitis in Israel. *Isr J Med Sci.* 33: 757-9.
158. Redfield DC, Underman A, Norman D, GD Oventurf. Cerebrospinal fluid penetration of vancomycin in bacterial meningitis. In: Nelson JD, Grassi C, eds. *Current chemotherapy and infectious disease. Proceedings of the 11th International Congress of Chemotherapy*

- and the 19th Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 1, Washington, DC: American Society for Microbiology, 1980: 638-640.
159. Chesney PJ, Davis Y, English BK, Wang WC. 1995. Occurrence of *Streptococcus pneumoniae* meningitis during vancomycin and cefotaxime therapy of septicemia in a patient with sickle cell disease. *Pediatr Infect Dis J.* 14: 1013-5.
 160. Friedland IR, Paris MM, Shelton S, McCracken GH Jr. 1994. Time-kill studies of antimicrobial combinations against penicillin-resistant and susceptible *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 34: 231-7.
 161. Yurtseven T, Suntur BM, Sipahi OR, Büke C, Büke M. 2005. Does rifampin and ceftriaxone can be an alternative to vancomycin and ceftriaxone in experimental penicillin and cephalosporin resistant-pneumococcal meningitis? *J Neurol Sci.* 22: 29-34.
 162. Viladrich PF, Tubau F, Cabellos C, Pallares R, Rufi G, *et al.* Vancomycin plus rifampin for therapy of adult pneumococcal meningitis. 9th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Berlín, Alemania. Març 1999. Abstract n° P616.
 163. Simon GL, Smith RH, Sande MA. 1983. Emergence of rifampin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* during combination therapy with vancomycin and rifampin: a report of two cases. *Rev Infect Dis.* 5 (Suppl 3): 507-8.
 164. McGee L, McDougal L, Zhou J, Spratt BG, Tenover FC, *et al.* 2001. Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by pneumococcal molecular epidemiology network. *J Clin Microbiol.* 39: 2565-71.
 165. 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.
 166. Liñares J, Tubau F, Viladrich PF, Gudiol F, Hakenbeck R, *et al.* Increase of penicillin and third generation resistance in meningeal isolates of *Streptococcus pneumoniae* in adult patients (1979-1994). 35th Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), San Francisco, EEUU, 1995. Abstract n° E24.
 167. McDougal LK, Rasheed JK, Biddle JW, Tenover FC. 1995. Identification of multiple clones of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 39: 2282-8.
 168. Eliopoulos GM, Moellering RC Jr. Antimicrobial combinations. In: Lorian V, ed. *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4th edn. Baltimore: The Williams & Wilkins Co., 1996; 330-96.

169. Shimojo N, Naka K, Nakajima C, Yoshikawa C, Okuda K, Okada K. 1989. Test-strip method for measuring lactate in whole blood. *Clin Chem.* 35:1992-4.
170. Duhamel RC, Meezan E, Brendel J. 1981. Determination of protein in cerebrospinal fluid, a new method. *J Biochem Biophys Methods* 5:67-74.
171. Cassinat B, Nicolas MH. 1994. Comparison of antibiotic combinations against penicillin-resistant pneumococci. *J Antimicrob Chemother.* 34: 785-90.
172. Chavanet P, Beloeil H, Pechinot A, Duigou F, Buisson JC, *et al.* 1995. *In vivo* activity and pharmacodynamics of cefotaxime or ceftriaxone in combination with fosfomycin in fibrin clots infected with highly penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 39: 1736-43.
173. Chavanet P, Peyrard N, Pechinot A, Buisson M, Duong M, *et al.* 1996. *In vivo* activity and pharmacodynamics of amoxicillin in combination with fosfomycin in fibrin clots infected with highly penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996 40: 2062-6.
174. Hendlin D, Stapley EO, Jackson M, Wallick H, Miller AK, *et al.* 1969. Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of streptomycetes. *Science* 166: 122-3.
175. Gobernado M. 2003. Fosfomicina. *Rev Esp Quimioter* 16: 15-40.
176. Chomarar M, Fredenucci I, Barbe G, Boucaud-Maitre Y, Boyer M, *et al.* 2002. Rhone-Alpes observatory of *Streptococcus pneumoniae* in 1999: 35 cases of meningitis. *Pathol Biol (Paris)* 50: 595-8.
177. Andrews JM, Baquero F, Beltran JM, Canton E, Crokaert F, *et al.* 1983. International collaborative study on standardization of bacterial sensitivity to fosfomycin. *J Antimicrob Chemother.* 12: 357-61.
178. Stahl JP, Croize J, Bru JP, Girard-Blanc MF, Francois P, *et al.* 1984. Diffusion of fosfomycin into the cerebrospinal fluid in purulent meningitis. *Presse Med.* 13: 2693-5.
179. Longuet P, Vallee E, Michel M, Perronne C, Janvier M, *et al.* 1993. Vancomycin in meningitis caused by penicillin G resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Presse Med.* 22: 1818-9.
180. Kuhnen E, Pfeifer G, Frenkel C. 1987. Penetration of fosfomycin into cerebrospinal fluid across non-inflamed and inflamed meninges. *Infection* 15: 422-4.

VIII. Annex

MEMÒRIA DESCRIPTIVA DEL PROCEDIMENT

PROCEDIMENT DE RECERCA

Projecte núm.:.....

1 - TÍTOL

Estudi experimental de la meningitis pneumocòcica produïda per soques amb elevada resistència a betalactàmics: eficàcia de combinacions amb diversos antimicrobians.

2 - OBJECTIUS

1. Determinar la capacitat inflamatòria, pel que fa a la pleocitosi, la producció de lactat, l'augment de concentració de proteïnes i la presència d'edema cerebral, de les soques amb elevada resistència a betalactàmics.
2. Determinar l'eficàcia terapèutica, pel que fa a la disminució en la concentració bacteriana de: ceftriaxona + rifampicina, ceftriaxona + teicoplanina, ceftriaxona + vancomicina, rifampicina + vancomicina vers 2 soques amb elevada resistència a betalactàmics i diferent patró fenotípic.
3. Determinar l'existència de sinèrgia *in vivo* en aquestes combinacions

3 - DECLARACIÓ SOBRE MÈTODES ALTERNATIUS

Per mètodes alternatius s'entenen aquells que no impliquen la utilització d'animals, permeten reduir el nombre d'animals a utilitzar o comporten un menor grau de patiment de l'animal.

Indiqueu els motius pels quals no es planteja aplicar un mètode alternatiu al procediment proposat :

- No existeix cap mètode alternatiu al procediment proposat
 Existeixen mètodes alternatius, però no estan validats
 Desconeix si existeixen mètodes alternatius
 Altres motius : (Especifiqueu-los detalladament)

4 - DESCRIPCIÓ DE LA MANIPULACIÓ DELS ANIMALS DE LABORATORI:

4.1. PROTOCOL D'ANESTÈSIA I ANALGÈSIA (Indiqueu productes, vies d'administració i dosi)

4.1.a –ANESTÈSIA:

Pel procediment quirúrgic del 1er dia i la inoculació s'utilitza ketamina (35 mg/kg) i xilazina (5 mg/kg) que s'administren via i.m.

Per l'extracció de les mostres els conills s'anestesien amb uretà (1.75 g/Kg. s.c.) sense recuperació de l'animal.

4.1.b –ANALGÈSIA:

Buprenorfina (0.05 mg/kg/12h s.c) durant tot el procediment.

4.2. PROTOCOL QUIRÚRGIC / EXPERIMENTAL - METODOLOGIA I DISSENY

Aquest procediment es realitza utilitzant el model de meningitis pneumocòcica en conill, establert per Dacey i Sande i que segueixen diversos grups de recerca en malalties infeccioses, arreu del món. És el model que més ha contribuït a avançar en el coneixement de la fisiopatologia de la meningitis bacteriana i en l'estudi de les noves possibilitats terapèutiques.

SUPERVISIÓ DE L'ANIMAL: una vegada arriben a les instal·lacions, els animals són establats durant una setmana per controlar que no siguin portadors de cap malaltia. Durant tot el protocol de manipulació, una vegada es treuen els animals de la gàbia, es fan una sèrie d'observacions per assegurar una situació basal adequada:

- aspecte general de l'animal: pelatge (color, volum), presència de ferides que es poden haver fet entre ells (en els cas que sigui superficials, es curen amb alcohol i iode i es sotmeten a vigilància durant tot l'experiment). En el cas que siguin greus (no s'ha donat mai el cas en experiències prèvies) se sacrificaria l'animal.

- comportament de l'animal: postura de descans dins la gàbia, mobilitat, crits quan es manipula. Els crits són signes de dolor, si persisteixen, l'animal és sacrificat. Tota anomalia en quant a mobilitat (en una escala de del 0-3, quan l'animal encara no ha estat inoculat, amb una disminució en un grau ≥ 1 se sacrificaria a l'animal. Després de la inoculació, una disminució en un grau ≥ 2 se sacrificaria a l'animal.

- aspectes concrets de l'animal: secreció llagrimal excessiva amb inflamació de la membrana nictitant. En funció del grau d'inflamació, l'animal és directament sacrificat o es consulta al veterinari de l'estabulari.

-pèrdua de pes: s'estudien les possibles causes. La presència de diarrea seria un motiu per sacrificar l'animal. En altres condicions es podrien administrar antibiòtic per intentar millorar la situació de l'animal, però en el nostre experiment no podem permetre interaccions entre diferents antibiòtics

Durant el procés d'infecció, tota complicació que pugui aparèixer, com per exemple: convulsions, hemorràgies, diarrees, o dificultats respiratòries es considera criteri de punt final i l'animal és immediatament sacrificat amb una sobredosi de pentothal (1ml i.v.).

PROTOCOL D'EXPERIMENTACIÓ:

El primer dia (dilluns), els conills s'anestèsien amb 35 mg/Kg. de ketamina i 5 mg/Kg. de xylazina i.m. i es col·loca sobre el crani una peça metàl·lica, protegida i fixada per un casc de ciment acrílic. Aquesta peça metàl·lica permetrà fixar-los a l'aparell d'estereoatàxia i obtenir mostres seriadades de LCR. Es dona un seguiment i control post-operatori mitjançant l'administració de buprenorfina 0.05 mg/kg/12h. Després de la intervenció, ens assurem que l'animal es recupera totalment de l'anestèsia i hi ha manca de crits quan el manipulem.

Vint-i-quatre hores després (dimarts) els animals es preparen per la fase d'inoculació. És molt important que l'animal es trobi en una situació basal adequada abans d'inocular-lo i iniciar-se el procés infecció, per tal d'evitar qualsevol incidència que pugui interferir en el desenvolupament de l'experiment. Els animals són anestesiats amb la mateixa pauta que el dia anterior i es col·loquen (anestesiats) en l'aparell d'estereoatàxia. S'introdueix una agulla de punció lumbar en la cisterna magna, s'extreuen 200 μ L de LCR i s'inoculen en l'espai subaracnoidal 10^6 ufc/mL (en un volum de 200 μ L) de *Streptococcus pneumoniae*. Després de la inoculació, ens assurem que l'animal es recupera totalment de l'anestèsia i no presenta signes de dolor (pe: crits).

Divuit hores després (temps que cal esperar per a que la meningitis estigui totalment establerta), els conills s'anestèsien amb uretà (1.75 g/Kg. s.c.). Quan els animals estan totalment anestesiats, s'extreu una mostra de sang d'un volum de 100 μ L com hemocultiu per determinar la presència de bacterièmia secundària i es col·loca un catèter endovenós a la vena marginal de l'orella. Es col·loquen de nou els animals a l'aparell d'estereoatàxia i s'extreu una mostra de 200 μ L de LCR corresponent a l'hora 0. S'administra aleshores la 1a dosi d'antibiòtic (1ml) via i.v. En els animals control, s'administra 1 ml de sèrum fisiològic via i.v.

A l'hora 2, s'extreu una mostra de LCR d'un volum de 300 μ L. A l'hora 6, s'extreu una mostra de LCR d'un volum de 200 μ L.

Les dosis antibiòtiquessegüents s'administren a diferents intervals segons l'esquema prefixat:

- CEFTRIAXONA i RIFAMPICINA cada 24 h
- VANCOMICINA cada 12 h.

Per a estudiar la corba d'eficàcia de cada grup terapèutic, s'extreuen mostres de LCR a l'hora 24 (volum de 300 μ L) i a l'hora 26 (volum de 300 μ L). A l'hora 26, els animals són sacrificats amb una sobredosi de pentothal i.v.

Supervisió dels animals: durant els diferents temps horaris en què hi ha presa de mostres (hores: 0, 2, 6, 24 i 26) i en el cas que s'hagi de venir a tractar a la nit (hora 12) es realitzen controls de l'estat del animal (tots els abans citats en l'apartat de Supervisió de l'animal, excepte els de mobilitat). S'assegura una correcta hidratació dels animals administrant sèrum fisiològic s.c. durant tot el procediment: a l'hora 2 s'administren 20 ml de SF, a l'hora 6 s'administren 40 ml de SF i a l'hora 24 s'administren 20 ml de SF. Si presenta cap complicació és sacrificat amb una sobredosi de pentothal (1ml i.v.).

Com a inòcul s'utilitzen **2 soques de *S.pneumoniae*** amb diferent susceptibilitat a betalactàmics, procedents d'aïllaments clínics: soca HUB 2349 i soca Memphis.

formaran **5 grups terapèutics:** ceftriaxona + rifampicina, ceftriaxona + teicoplanina, ceftriaxona + vancomicina, rifampicina + vancomicina, i control (inoculat però no tractat).

Els experiments de tractament requereixen:

8 animals x 2 soques x 5 grups terapèutics = 80 conills

5 - TRACTAMENTS

PRODUCTES UTILITZATS / TRACTAMENT POSTOPERATORI:

Els tractaments inclouran diferents antibiòtics betalactàmics, glicopèptids, rifamicines, sols i en combinació.

RISC DE ZONOSI: CATEGORIA DE RISC BIOLÒGIC per ús de *Streptococcus pneumoniae*: Nivell 2

L'inòcul es prepara en el Departament de Microbiologia i es transporta fins l'estabulari dins d'un tub de vidre que es col·loca dins d'un recipient especialment dissenyat per la manipulació i transport de substàncies biològiques (BIOTAINER). El personal va vestit amb bata de laboratori, i utilitza en tot moment guants i mascareta quirúrgica. Amb unes xeringues estèrils, l'inòcul s'injecta directament en cisterna magna, per tant, no hi ha possibilitats de dispersió en el medi. Tot el material "contaminat" que s'utilitza durant el procés d'inoculació es llença a contenidors especials de color groc que posteriorment són recollits i incinerats.

Una vegada finalitzat el protocol de treball, els animals són depositats en bosses i es col·loquen dins d'uns contenidors, dins del congelador que l'estabulari té per animals morts. Aquests contenidors són recollits i transportats fins la planta incineradora. El personal de neteja desinfecta les gàbies en les instal·lacions que l'estabulari té per aquest servei. El personal manipulador disposa d'una pica amb Clorhexidina (antisèptic i desinfectant comercialitzat amb el nom de Hibiscrub®), per rentar-se les mans abans d'abandonar les instal·lacions.

TREBALL AMB ISÒTOPS RADIACTIUS : NO

VIES D'ADMINISTRACIÓ / EXTRACCIÓ: Administració endovenosa dels antibiòtics

6 - ANIMALS A UTILITZAR

| Espècie | Soca | Sexe | Pes | Edat |
|---------|-------------------|---------|----------|------|
| Conill | White New Zealand | Femella | 1,5-2 kg | |

NOMBRE TOTAL D'ANIMALS :

DURADA: 4 dies

FREQÜÈNCIA : 4-8 per setmana

Indiqueu si s'ha consultat alguna persona experta en estadística la idoneïtat del disseny experimental, del nombre d'animals a utilitzar i de les anàlisis estadístiques que s'aplicarien

SI **Nom i cognoms de la persona consultada:**

NO **Motius:**

Experiència prèvia del nostre grup i bibliografia consultada en aquets model experimental.

7- DESTINACIÓ FINAL DELS ANIMALS

EN FINALITZAR EL PROCEDIMENT D'EXPERIMENTACIÓ :

ESTÀ PREVIST MANTENIR ELS ANIMALS AMB VIDA

ESTÀ PREVIST SACRIFICAR-LOS

EXPLIQUEU ELS MOTIUS :

PROTOCOL D'EUTANÀSIA EN CAS DE SACRIFICI :

Els animals es sacrifiquen amb una sobredosi de penthotal endovenòs.

8 - INSTAL·LACIONS

INDIQUEU EL LLOC ON ES MANTINDRAN ELS ANIMALS DURANT EL PROCEDIMENT:

Instal·lacions de l'estabulari del Campus de Bellvitge.

MEMÒRIA DESCRIPTIVA DEL PROCEDIMENT

PROCEDIMENT DE RECERCA

Projecte núm.:

1 - TÍTOL

Estudi experimental de la meningitis pneumocòcica produïda per soques amb elevada resistència a betalactàmics: estudis de farmacocinètica antibiòtica.

2 - OBJECTIUS

1. Determinar la capacitat de generar meningitis de soques amb resistència molt elevada a betalactàmics.
2. Realitzar els estudis farmacocinètics amb els antibiòtics (fosfomicina, rifampicina, ceftriaxona, gemifloxacina, amoxicil·lina i teicoplanina), que posteriorment s'utilitzaran en els estudis d'eficàcia terapèutica en el tractament de la meningitis pneumocòcica produïda per soques amb elevada resistència a betalactàmics.

3 - DECLARACIÓ SOBRE MÈTODES ALTERNATIUS

Per mètodes alternatius s'entenen aquells que no impliquen la utilització d'animals, permeten reduir el nombre d'animals a utilitzar o comporten un menor grau de patiment de l'animal.

Indiqueu els motius pels quals no es planteja aplicar un mètode alternatiu al procediment proposat :

- No existeix cap mètode alternatiu al procediment proposat
 Existeixen mètodes alternatius, però no estan validats
 Desconeix si existeixen mètodes alternatius
 Altres motius : (Especifiquen-los detalladament)

6 - ANIMALS A UTILITZAR

| Espècie | Soca | Sexe | Pes | Edat |
|---------|-------------------|---------|----------|------|
| Conill | White New Zealand | Femella | 1,5-2 kg | |

NOMBRE TOTAL D'ANIMALS :

DURADA: 3 dies

FREQÜÈNCIA : 4-8 per setmana

MEMÒRIA DESCRIPTIVA DEL PROCEDIMENT

PROCEDIMENT DE RECERCA

Projecte núm.:.....

1 - TÍTOL

Estudi experimental de la meningitis pneumocòcica produïda per soques amb elevada resistència a betalactàmics: eficàcia de la fosfomicina sola o en combinació amb diversos antimicrobians.

2 - OBJECTIUS

1. Determinar la capacitat inflamatòria, pel que fa a la pleocitosi, la producció de lactat i la presència d'edema cerebral, de les soques amb elevada resistència a betalactàmics.
2. Determinar l'eficàcia terapèutica, pel que fa a la disminució en la concentració bacteriana, nivells en sèrum i líquid cefaloraquidi, i poders bactericides, de fosfomicina, fosfomicina + amoxicil·lina, fosfomicina + ceftriaxona, fosfomicina + rifampicina, fosfomicina + gemifloxacina vers 3 soques amb elevada resistència a betalactàmics i diferent patró fenotípic.
3. Determinar l'existència de sinèrgia *in vivo* en algunes combinacions

3 - DECLARACIÓ SOBRE MÈTODES ALTERNATIUS

Per mètodes alternatius s'entenen aquells que no impliquen la utilització d'animals, permeten reduir el nombre d'animals a utilitzar o comporten un menor grau de patiment de l'animal.

Indiqueu els motius pels quals no es planteja aplicar un mètode alternatiu al procediment proposat :

- No existeix cap mètode alternatiu al procediment proposat
 Existeixen mètodes alternatius, però no estan validats
 Desconeix si existeixen mètodes alternatius
 Altres motius : (Especifiquen-los detalladament)

6 - ANIMALS A UTILITZAR

| Espècie | Soca | Sexe | Pes | Edat |
|---------|-------------------|---------|----------|------|
| Conill | White New Zealand | Femella | 1,5-2 kg | |

NOMBRE TOTAL D'ANIMALS :

DURADA: 3 dies

FREQÜÈNCIA : 4-8 per setmana