

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Facultat de Medicina

Departament de Ciències Clíiques

**PROBLEMÁTICA DE LA ANTIBIOTERAPIA
EN LA INFECCIÓN DE PRÓTESIS ARTICULAR.
UNA APROXIMACIÓN MEDIANTE UN MODELO ANIMAL DE
INFECCIÓN DE CUERPO EXTRAÑO
POR *Staphylococcus aureus* METICILÍN-SENSIBLE.**

Memoria presentada por
ÓSCAR MURILLO RUBIO
para optar al grado de Doctor en Medicina

Barcelona, Junio de 2009

El **Dr. Javier Ariza Cardenal**, Profesor de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona y Jefe clínico del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitari de Bellvitge hace constar que la tesis doctoral titulada

“Problemática de la antibioterapia en la infección de prótesis articular. Una aproximación mediante un modelo animal de infección de cuerpo extraño por *Staphylococcus aureus* meticilín-sensible”

que presenta el licenciado **Óscar Murillo Rubio** ha sido realizada bajo su dirección en la Facultad de Medicina del Hospital Universitari de Bellvitge, la considera finalizada y autoriza su presentación para que sea defendida ante el tribunal que corresponda.

En Barcelona, Junio de 2009

Dr. Javier Ariza Cardenal

A tu, Lourdes
per traçar un camí meravellós
amb la teva continuïtat.
I a l'Oriol,
per dibuixar-nos un futur generós.

A vosotros, papas
por quererme desde siempre,
y por traerme hasta aquí
dejándome hacer
y guiándome al mismo tiempo.
A ti, Yolanda
por completar el vínculo.

...Y a ti, yaya
porque me marcaste
para toda la vida...

“(...) aprendí a no creer con demasiada firmeza en nada de lo que se me hubiera convencido sólo mediante el ejemplo y la costumbre, y así me liberé paulatinamente de muchos errores”

Discours de la méthode
René Descartes

Además, yo sabía por Wakefield que el Maestro gustaba, como él mismo decía, de “alumbrar las almas”. (...) hablaba largamente, con los ojos entrecerrados, rodeado por la multitud ávida de sus discípulos. Evocaba recuerdos, contaba anécdotas, deduciendo moralejas picantes y profundas. Y si entre esos jóvenes bien educados había alguno que le hacía frente, Parrottin se interesaba especialmente en él. Lo incitaba a que hablara, lo escuchaba atentamente, le sugería ideas, temas de meditación. Era forzoso que un día el joven lleno de ideas generosas, excitado por la hostilidad de los suyos, cansado de pensar solo y contra todos, pidiera al Jefe que lo recibiese a solas; y balbuciente de timidez, le entregaba sus más íntimos pensamientos, sus indignaciones, sus esperanzas. Parrottin lo estrechaba contra su pecho. Decía: “Lo comprendo, lo comprendí desde el primer día”. Conversaba. Parrottin iba lejos, más lejos aún, tan lejos que el muchacho lo seguía a duras penas. Con algunas pláticas por el estilo, podía observarse una sensible mejoría en el joven rebelde. Veía claro en sí mismo, aprendía a conocer los vínculos profundos que lo ligaban a su familia, a su medio; comprendía por fin el papel admirable de la “élite”. Y para terminar, como por arte de magia, la oveja descarriada que había seguido a Parrottin paso a paso, se encontraba en el redil, ilustrada, arrependida.

La Nausea
Jean-Paul Sartre

(...) por los “errores” que me quedaron y los que vinieron he “aprendido” a vivir entre ellos: son el “ejemplo” de mi experiencia y el punto de partida de mi continuo aprendizaje.

Yo sabía por Wakefield (AM) que el Maestro (JA) gustaba de “alumbrar las almas”. (...) hablaba largamente, “caricaturizaba” las situaciones para escandalizar y provocar a la “multitud de jóvenes” que lo rodeaba. Era lógico que entre esos jóvenes surgiera siempre alguno al que se le despertara la curiosidad por adentrarse en el “universo de la tutela del Maestro”. Un día ese joven (OM) lleno de ideas “generosamente desorganizadas”, excitado por la hostilidad de su medio (que había descubierto 5 años antes), cansado de pensar solo y contra todos, pidió al Jefe que lo recibiese a solas y balbuciente de timidez, de igual forma que le libró las “llaves olvidadas? en la cerradura”, le entregó sus más íntimos pensamientos, sus indignaciones, sus esperanzas. El Maestro se retiró sus gafas con ceremoniosa calma y “soltó su primera andanada” diciendo: “Lo comprendo, pero...”. Conversaron; el Maestro lo incitó a que hablara, lo escuchó y le sugirió muchas ideas y temas con los que aprender meditando; lo llevó lejos, muy lejos, lo “descolocó” una y otra vez. Con muchas pláticas por el estilo, pudo observarse una mejoría en el joven rebelde: veía claro..., veía claro el “ruido” y el apasionante universo que siempre había estado tras él. Y para terminar, como por arte de magia, la oveja descarriada (el joven OM) que había seguido al Maestro paso a paso (“disciplinadamente y con toda la fe de la que podía disponer”), se encontraba en el redil, agradecida..., muy agradecida e ilustrada.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Javier Ariza, Jefe clínico del Servicio de Enfermedades Infecciosas y director de esta tesis: GRACIAS, GRACIAS...múltiples y en mayúsculas.

Gràcies Xavier, per la continua estimulació científica i personal, pel contagiós entusiasme del dia a dia, per la lluita infatigable contra el minimalisme "mal entès", per no defallir mai, per les empentes inicial i final i per les "andanades" de mig recorregut,...perquè tot ha impregnat el resultat final. Gràcies pel teu contemporani Humanisme, per aquella porta de despatx permanentment oberta, per les ¿llargues? plàtiques dels divendres tarda (i les dels dijous, dimecres,...), per presentar-me una manera de ser metge que hauria de ser exemple de tots,... I en especial, gràcies per la paternal amistat que he rebut de tu; per acollir-me, reorientar-me i afavorir que així, tot rodant, la "pedra dura" també continuï pulint-se. Gràcies per permetre la impactant trobada, sempre et tindrè present.

A mis compañeros de laboratorio.

A l' Àlex, perquè sense tu no haguessim pogut començar, perquè vas aconseguir que qui es movia entre fonendos i malalts aprengué a situar-se entre plaques de cultiu i pipetes, perquè junts vam gaudir dels resultats primers i perquè em fa content saber que també participes dels finals,... i sobretot pels vincles traçats en aquest temps.

A Menia, porque llegaste con tu alegría para contagiarme y me ofreciste tu amistad desde el primer momento, porque fuiste una ayuda en las etapas duras...ya sabes que eres artista destacada en todo este trabajo!

Als companys del principi, la Sandra i el Ferran, per totes les converses i les estones de laboratori que vam compartir. Y a los actuales, a Carmen porque llegaste con una ilusión desbordante a recoger el testigo, por ofrecerme tu afecto...ánimo en tu viaje "estelar" con el cuerpo extraño!

A todos y a cada uno de los integrantes del Servicio de Enfermedades Infecciosas, porque durante estos años he recibido mucho a nivel personal y he aprendido a ser médico al amparo de vuestros ejemplos.

Al Dr. Francesc Gudiol, per facilitar-me l'estada i, especialment, per les converses finals.

Al Dr. Pedro F. Viladrich porque son "impagables" sus consejos y porque quiero recordar siempre su manera de hacer y de ser médico. A la Dra. Carme Cabellos per la seva estima, pel seu incondicional i entusiasta suport, i també per les directrius prestades. A la Dra. Carme Peña per la seva complicitat i per l'afecte que he rebut, per l'apadrinament des de la "primera endocarditis",... perquè sempre ha estat un referent!.

A la Dra. Imma Grau, per la transcendència de la seva amistat, per la seva complicitat i per les ensenyances que he rebut des que vaig arribar. Als Drs. Jordi Carratalà, Miguel Santín, Miquel Pujol i Núria Fernández, perquè també m'emporto vivències i records vostres. ...I al Dr. Gabi Rufí, perquè els records te'ls vas endur tu, però aquí vas deixar gent impregnada.

Al conjunto de jóvenes infectólogas-os. A Gorane, por haber sido la cómplice perfecta en el enlace hospital-laboratorio, por tu incondicional afecto y entrega; gracias por permitirme que te tratara como a una hermana pequeña, a pesar de lo grande que te

has hecho...eskerrik asko!. Al resto de “princesas de la corte”: la Cris, la Carol, la Susana i la Carlota, per tot el que hem viscut junts, per entendre’m i compartir-me les vostres inquietuts, perquè són dignes de recordar aquelles estades en terres llunyanes. Y a Jaime y Oriol, gràcies per l’afortunada trobada final.

Al Servicio de Microbiología en pleno, porque me acogieron afectuosamente desde el primer momento y porque siempre he recibido total predisposición y facilidades por su parte.

A la Dra. Fe Tubau, perquè no he tingut mai un “no” per resposta i per poder gaudir del seu somriure en tot moment. Als Drs. Fina Liñares, Ricard Verdaguer, M^a Ángeles Domínguez i Jordi Niubó perquè en algun moment també vaig anar a “tirar” de la vostra bata demanant ajuda i sempre vaig tornar amb satisfacció.

Al personal del Estabulario del Campus de Bellvitge de la Universitat de Barcelona: Álvaro, Pedro, Pilar y Natacha. En especial a Pedro, por ser el principal “socio” de todo el aparato logístico de los pequeños roedores y por haberme tratado siempre tan bien; y a Pilar, perquè en l’anada i la tornada sempre he rebut somriures i facilitats de part seva.

A todos aquellos amigos-compañeros del Hospital (aquí anónimos) “encontrados” durante este trayecto. Porque estas líneas no pueden hacer justicia de todo lo que hemos compartido y lo que aprendido de ellos y con ellos; porque esa convivencia ha hecho que el día a día fuera aún más agradable.

A mis amigos “de siempre”: César i Josep, Marcos, Conxita, Sara. Perquè m’enriqueix la vostra companyia i he arribat fins aquí impregnat d’ella. Perquè totes les vivències que hem acumulat junts fan que continuem creixent plegats.

A toda mi familia. En especial, a mis padres, porque soy ahora lo que vosotros empezasteis ayer; porque sois mi ejemplo y mi continua referencia; por todo lo que me seguís dando...También a ti, Yolanda, porque completas mi espacio vital...

A Lourdes, perquè no puc concebre el viatge sense la teva companyia...

Esta tesis se ha realizado con el apoyo económico de

Red Española para la Investigación en Patología Infecciosa

(REIPI C03/14 y REIPI RD06/0008)

Los estudios han sido financiados por el

Fondo de Investigaciones Sanitarias

Ministerio de Sanidad

Beca FIS 04/0103

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

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

Publicaciones en revistas indexadas

1. **O. Murillo**, A. Domenech, A. Garcia, F. Tubau, C. Cabellos, F. Gudiol, J. Ariza. "Efficacy of high doses of levofloxacin in experimental foreign-body infection by methicillin-susceptible *S. aureus*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2006; 50:4011-4017.
2. **O. Murillo**, ME. Pachón, G. Euba, R. Verdaguer, M. Carreras, C. Cabellos, J. Cabo, F. Gudiol, J. Ariza. "Intracellular antimicrobial activity appearing as a relevant factor in the antibiotic efficacy against an experimental foreign-body infection by *S. aureus*." In review.
3. **O. Murillo**, ME. Pachón, G. Euba, R. Verdaguer, F. Tubau, C. Cabellos, J. Cabo, F. Gudiol, J. Ariza. "High doses of levofloxacin vs moxifloxacin against staphylococcal experimental foreign-body infection: the effect of higher MIC-related pharmacokinetic parameters on efficacy." Journal of Infection 2009; 58:220-226.
4. **O. Murillo**, ME. Pachón, G. Euba, R. Verdaguer, F. Tubau, J. Cabo, C. Cabellos, F. Gudiol, J. Ariza. "Antagonistic effect of rifampin on the efficacy of levofloxacin at high doses in staphylococcal experimental foreign-body infection." Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2008; 52:3681-3686.
5. **O. Murillo**, A. Doménech, G. Euba, R. Verdaguer, F. Tubau, J. Cabo, C. Cabellos, F. Gudiol, J. Ariza. "Efficacy of linezolid alone and in combination with rifampin in staphylococcal experimental foreign-body infection." Journal of Infection 2008; 57:229-235.

Comunicaciones en congresos

1. **O. Murillo**, A. Domenech, A. García, F. Tubau, C. Cabellos, F. Gudiol, J. Ariza. "Eficacia de levofloxacino a altas dosis en la infección estafilocócica de cuerpo extraño." (P648). XII Congreso Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Valencia del 10 al 13 Mayo de 2006.
2. **O. Murillo**, A. Domenech, A. García, F. Tubau, C. Cabellos, F. Gudiol, J. Ariza. "Stationary phase in vitro studies predicting antimicrobial efficacy in staphylococcal experimental foreign-body infection." 12th International Congress on Infectious Diseases, Lisboa del 15 al 18 Junio 2006.

3. **O. Murillo**, G. Euba, A. Domenech, A. García, F. Tubau, C. Cabellos, F. Gudiol, J. Ariza. *"Efficacy of linezolid alone and in combination with rifampin in staphylococcal experimental foreign-body infection."* (P1776) 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Munich del 31 Marzo al 3 Abril de 2007.

4. **O. Murillo**, G. Euba, M.E. Pachón, R. Verdaguer, F. Tubau, C. Cabellos, J. Cabo, F. Gudiol, J. Ariza. *"High doses of levofloxacin vs. moxifloxacin against staphylococcal experimental foreign-body infection: the effect of improving pharmacodynamics on the efficacy."* (P-B822) 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Chicago del 17 al 20 Septiembre de 2007

5. **O. Murillo**, ME. Pachón, G. Euba, R. Verdaguer, F. Tubau, C. Cabellos, J. Cabo, F. Gudiol, J. Ariza. *"Efficacy of levofloxacin alone and in combination with rifampin in staphylococcal experimental foreign-body infection"*. (P1912) 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelona del 19 al 22 Abril de 2008.

6. **O. Murillo**, ME Pachón, G. Euba, R. Verdaguer, F. Tubau, C. Cabellos, J. Cabo, F. Gudiol, J. Ariza. *"Impacto de las bacterias intracelulares sobre la eficacia antibiótica en la infección experimental estafilocócica de cuerpo extraño."* (P105) XIII Congreso Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Madrid del 11 al 14 Mayo de 2008.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	21
I. INTRODUCCIÓN.....	23
1. Las infecciones de implantes ortopédicos: estado actual.....	25
2. Particularidades de la infección de cuerpo extraño.....	28
2.1 Biofilm bacteriano.....	28
2.1.1 Fases en la formación del biofilm.....	28
2.1.2 Comunicación entre bacterias: “ <i>quorum-sensing</i> ”.....	29
2.2 Alteraciones fenotípicas de las bacterias.	
Tolerancia y resistencia antibiótica.....	29
2.3 Alteraciones funcionales de las células fagocitarias y del sistema inmunitario.....	32
3. <i>Staphylococcus aureus</i>.....	33
3.1 Características microbiológicas.....	33
3.2 Patogenia y factores de virulencia.....	33
3.3 <i>S. aureus</i> en las infecciones de implantes ortopédicos.....	34
3.4 Antibioterapia de las infecciones estafilocócicas asociadas a implantes ortopédicos.....	35
3.4.1 Rifampicina.....	35
3.4.2 Fluoroquinolonas: ciprofloxacino y ofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino.....	36
3.4.3 Beta-lactámicos (cloxacilina) y glucopéptidos (vancomicina).....	37
3.4.4 Nuevos antibióticos: linezolid.....	37
4. Modelos animales de infección experimental.....	38
4.1 Ventajas y limitaciones.....	38
4.2 Modelo experimental de infección de cuerpo extraño en rata por <i>S. aureus</i>	39
II. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO E HIPÓTESIS DEL TRABAJO.....	41
III. OBJETIVOS.....	45

IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	49
1. Selección de la cepa bacteriana de <i>S. aureus</i> meticilín-sensible.....	51
2. Agentes antimicrobianos.....	51
3. Estudios <i>in vitro</i>.....	52
3.1 Fases exponencial y estacionaria del crecimiento bacteriano <i>in vitro</i>	52
3.2 Estudios preliminares: influencia del inóculo bacteriano y del medio de nutrientes en la actividad bactericida de los antibióticos.....	53
3.3 Determinación de CMI y CMB.....	54
3.4 Curvas de letalidad.....	54
3.5 Determinación de la concentración preventiva de mutantes (CPM) de las fluoroquinolonas.....	55
4. Estudios terapéuticos en animales.....	57
4.1 Metodología para la estandarización del modelo experimental de infección de cuerpo extraño.....	57
4.2 Obtención y procesamiento de las muestras.....	58
4.3 Diseño experimental del modelo de infección de cuerpo extraño en rata: protocolo esquemático.....	60
5. Estudios de farmacocinética.....	62
5.1 Metodología.....	62
5.2 Determinación de niveles de antibiótico.....	62
5.3 Selección de las dosis de antibióticos: criterios razonables farmacocinéticos y farmacodinámicos.....	64
5.4 Grupos terapéuticos.....	65
6. Estudios de resistencia a los antibióticos.....	66
6.1 Detección de cepas resistentes en placas de agar con antibiótico.....	66
6.2 Estudio de poblaciones bacterianas.....	66
7. Estudios estadísticos.....	67

V. RESULTADOS	69
1. Objetivo <i>primero</i>	71
(Artículos 1 y 2).....	81
2. Objetivo <i>segundo</i>	83
3. Objetivo <i>tercero</i>	90
(Artículo 3).....	95
4. Objetivo <i>cuarto</i>	97
(Artículo 4).....	101
5. Objetivo <i>quinto</i>	103
(Artículo 5).....	107
VI. DISCUSIÓN	109
1. Modelo de infección de cuerpo extraño por <i>S. aureus</i> meticilín sensible en ratas.....	111
2. Eficacia de diversos antibióticos como monoterapia de la infección experimental de cuerpo extraño. Correlación de los resultados <i>in vitro-in vivo</i>	113
3. Eficacia de las nuevas fluoroquinolonas (levofloxacino y moxifloxacino) y su relación con los parámetros farmacodinámicos.....	116
4. Eficacia de la combinación levofloxacino-rifampicina en la infección experimental de cuerpo extraño por <i>S. aureus</i> meticilín sensible.....	119
5. Eficacia de linezolid en solitario y en combinación con rifampicina en la infección experimental de cuerpo extraño por <i>S. aureus</i> meticilín sensible.....	121
VII. CONCLUSIONES	125
VIII. BIBLIOGRAFÍA	131

ABREVIATURAS

SASM:	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a meticilina
SARM:	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
CMI:	Concentración mínima inhibitoria
CMB:	Concentración mínima bactericida
CPM:	Concentración preventiva de mutantes (Mutant prevention concentration)
AUC:	Area under the concentration-time curve (área bajo la curva)
C_{max}:	Concentración máxima (pico)
t_{1/2}:	Vida media
PK/PD:	Pharmacokinetic/pharmacodynamic (farmacocinético/-dinámico)
UFC:	Unidades formadoras de colonias
TCF:	Tissue cage fluid (líquido de las cajas)
TSA:	Tripticase soy agar (agar de tripticasa-soja)
TSB:	Tripticase soy broth (caldo de tripticasa-soja)
MHB:	Mueller-Hinton broth (caldo de Mueller-Hinton)
MHA:	Mueller-Hinton agar (agar de Mueller-Hinton)
PBS:	Phosphate buffered saline (solución tampón fosfato salino)
CXA/OXA:	Cloxacilina
VAN:	Vancomicina
RIF:	Rifampicina
LVX:	Levofloxacino
MXF:	Moxifloxacino
LZD:	Linezolid

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. LAS INFECCIONES DE IMPLANTES ORTOPÉDICOS: ESTADO ACTUAL

La infección de prótesis articulares constituye actualmente un grave problema de salud pública, ya que estas infecciones suponen una catástrofe para el paciente, una carga asistencial importante y un gravoso aumento del gasto en términos económicos para el sistema sanitario.

En los últimos tiempos se ha ido incrementando el número de intervenciones quirúrgicas de implantación de prótesis articulares (artroplastias) realizadas en los hospitales españoles hasta convertirse en una práctica diaria. Esta circunstancia viene determinada por el envejecimiento progresivo de la población que proporciona un gran número de candidatos a este tipo de intervenciones y por el continuo desarrollo tecnológico aporta unos procedimientos y materiales cada vez más accesibles (1-3).

Si bien no existen estudios estrictos al respecto, en el estado español el número de artroplastias anuales se estima en unas 30.000, repartidas mayoritariamente entre las localizaciones de rodilla y cadera, y la incidencia de infección protésica articular se cifra en torno al 3-4% (4). Asimismo, el riesgo de infección de una prótesis articular persiste a lo largo de toda la vida de la artroplastia; en este sentido la tasa de infección se cifró en un estudio en 5,9 por 1000 prótesis-año los dos primeros años tras el implante y en 2,3 por 1000 prótesis-año los siguientes 8 años. Los factores de riesgo asociados a esta infección son la presencia de infección superficial de la herida quirúrgica en el postoperatorio inmediato, una clasificación operatoria NNIS (National Nosocomial Infection Surveillance) superior a 2, la presencia concomitante de neoplasia y la previa realización de artroplastias en la misma localización. También se han asociado a un mayor riesgo enfermedades de base tales como diabetes mellitas y artritis reumatoide, el tratamiento con corticoides, la obesidad, la desnutrición y la infección urinaria concomitante (1;5-7).

Estas infecciones protésicas presentan unas características particulares, determinadas por la presencia del material extraño y su relación con los microorganismos y el tejido del huésped. Estas particularidades, que serán más

detalladas a continuación, se relacionan especialmente con la presencia de una biocapa de glucoproteínas denominada “biofilm” y con la expresión fenotípica de tolerancia bacteriana a los antibióticos (8-10).

Los microorganismos mayoritariamente implicados en estas infecciones son *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa negativo* (entre ambos ocupan el 60% de los agentes causales); entre el resto de agentes responsables predominan estreptococos diversos, enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* (3).

Las formas clínicas de las infecciones protésicas se clasifican en función del tiempo de aparición tras su implantación y de su forma de expresión. Así la clasificación más ampliamente utilizada, la de Tsukayama et al. (2;11), distingue cuatro formas clínicas:

- 1/ infección postquirúrgica precoz, de aparición en el primer mes después de la artroplastia, se caracteriza por la presencia de signos inflamatorios locales y en ocasiones sintomatología sistémica con fiebre y bacteriemia.
- 2/ infección postquirúrgica tardía, aparece más allá del primer mes después de la implantación de la prótesis, y en ella predomina la clínica ortopédica con dolor, limitación funcional de la prótesis y aflojamiento de la misma.
- 3/ infección hematógena. Se caracteriza por su presentación aguda con clínica de dolor y signos inflamatorios locales en el contexto de una bacteriemia, independientemente del tiempo en que aparezca en relación con la artroplastia.
- 4/ cultivos intraoperatorios positivos. Se presenta en aquellos casos con sospecha inicial de aflojamiento de la prótesis de causa no infecciosa en los cuales se realiza un recambio de la artroplastia y los cultivos intraoperatorios resultan con franco crecimiento de microorganismos.

La clasificación de Tsukayama et al. resulta útil para el manejo tanto diagnóstico como terapéutico de los pacientes. Así, respecto a los métodos diagnósticos habrá que incluir los signos y síntomas de presentación, las exploraciones complementarias (analíticas y pruebas de imagen) y los cultivos microbiológicos (preoperatorios y/o intraoperatorios) (12-15). En cuanto al manejo terapéutico, éste

implicará generalmente algún tipo de intervención quirúrgica asociado a la administración prolongada de antibióticos, seleccionados en base a las particularidades de estas infecciones. Las infecciones postquirúrgica precoz y hematógena pueden tratarse mediante un desbridamiento quirúrgico y el mantenimiento de la prótesis, por lo que en estos casos la antibioterapia jugará un papel primordial (3;16;17). Por contra, la infección postquirúrgica tardía suele requerir el recambio de la prótesis articular por otra nueva en un acto quirúrgico único (recambio en un tiempo) o múltiple (recambio en dos tiempos) (3;18;19).

Precisamente esta dificultad en el tratamiento y el manejo de las infecciones protésicas articulares en la práctica clínica ha determinado la formación de grupos multidisciplinares en varios países europeos de nuestro entorno, como en el caso de Francia y Suiza. En el año 2003, se constituyó en España una red temática de centros sobre patología infecciosa (REIPI; 2003-2006), reconocida oficialmente por el ISCIII, y que incluyó la infección de la prótesis articular entre sus líneas prioritarias de estudio. Nuestro centro forma parte de REIPI y en su nueva etapa como RETICS (2007-2010), la REIPI mantiene su actividad en esta misma línea de trabajo.

2. PARTICULARIDADES DE LA INFECCIÓN DE CUERPO EXTRAÑO

Es bien conocido que la infección de material protésico presenta unas particularidades específicas que determinan una dificultad añadida para su curación. Esto es debido a que las bacterias implicadas en estas infecciones quedan incluidas en una matriz de polisacáridos y proteínas denominada "biofilm" y sufren una serie de cambios fenotípicos que las hacen más tolerantes a los antibióticos (8;9). También la evidencia de variantes bacterianas de colonia pequeña metabólicamente menos activas (20), la deficiente función de las células fagocitarias en las inmediaciones del cuerpo extraño y la presencia de bacterias intracelulares son otros factores determinantes en la pobre respuesta antimicrobiana observada en estas infecciones (21;22).

2.1 Biofilm bacteriano

Las bacterias en contacto con una superficie (biológica o artificial) pueden adherirse a ella y posteriormente, crear puentes de unión entre ellas para agregarse. El conjunto de bacterias produce una serie de glucoproteínas que englobarán a la nueva población bacteriana que surge de la división celular. Se denomina biofilm a esta matriz de estructura glucoproteica que engloba al conjunto de bacterias interrelacionadas y adheridas a una superficie y que establece las bases para la funcionalidad y viabilidad de todas ellas (9;10;23;24).

El biofilm es considerado una estrategia sofisticada de supervivencia bacteriana en el medio natural y se ha implicado hasta en un 60% de las infecciones bacterianas en humanos (9).

2.1.1 Fases en la formación de biofilm

En la formación del biofilm se han identificado una serie de fases sucesivas (9):

1. La primera etapa es la adherencia de la bacteria a la superficie protésica. En el medio, las bacterias suelen encontrarse en estado planctónico, con un metabolismo activo y división celular exponencial. Al entrar en contacto con una superficie (biológica o artificial) se adhieren a ella utilizando elementos patogénicos diversos; entre ellos, se ha implicado principalmente a fibronectina.

2. Agregación de bacterias y formación de microcolonias. Una vez que diversas bacterias se han adherido a la misma superficie, se establecen puentes de unión proteicos entre ellas que determinan su agregación. A continuación las bacterias inician la división y multiplicación celular formando grupos de microcolonias.

3. Producción de glucocálix y creación de microambientes dentro del biofilm. Estas bacterias producen una serie de proteínas (exopolisacáridos), denominado glucocálix, que englobarán al conjunto de bacterias y que creará una serie de comunicaciones entre ellas, a modo de canales, por las que difunden los nutrientes. Existen variaciones del pH, oxígeno y nutrientes entre la porción profunda del biofilm (en contacto con la superficie protésica) y la más superficial, por lo que el resultado final será la agrupación de una población bacteriana heterogénea, con estados metabólicos distintos.

4. Liberación de bacterias. El biofilm se considera una entidad dinámica y de las capas superficiales pueden desprenderse las bacterias, que recuperan nuevamente un estado planctónico con plena actividad metabólica.

2.1.2 Comunicación entre bacterias: "quorum-sensing"

Las bacterias en el interior del biofilm son una auténtica comunidad y como tal crearán sus vínculos. Se denomina "quorum-sensing" a este conjunto de mecanismos, que permiten su funcionamiento de forma colectiva y coordinada en el interior del biofilm; este término fue introducido por primera vez por Fuqua et al (25-27). Para ello, las bacterias producen una serie de moléculas químicas y tras alcanzar unos niveles determinados, en una forma dependiente de la densidad de población bacteriana, se expresan determinados genes. Estos genes están implicados en distintos procesos fisiológicos bacterianos tales como movilidad, metabolismo, maduración, virulencia, etc. Un ejemplo de sistema "quorum sensing" bien estudiado en *S. aureus* es el denominado *agr* (accessory gen regulator) que se ha implicado, entre otras cosas, en la formación del biofilm (26).

2.2 Alteraciones fenotípicas de las bacterias. Tolerancia y resistencia antibiótica

La adherencia de las bacterias a un cuerpo extraño y su localización en el interior del biofilm comportan, como mecanismo de supervivencia, el desarrollo de

formas fenotípicas con metabolismo mínimo (*durmientes o esporuladas*) (9;10). Estas bacterias no son mutantes, genéticamente diferentes de las iniciales, sino simplemente una expresión fenotípica distinta, que puede afectar diversos ámbitos del metabolismo bacteriano (división celular, síntesis de proteínas, tamaño bacteriano,...) y su sensibilidad a los antibióticos. Las consecuencias patogénicas derivadas de estas variaciones en las infecciones protésicas resultan obvias (28;29).

Las formas bacterianas del interior del biofilm con un metabolismo mínimo expresan una mayor tolerancia a los antibióticos, que se traduce en una concentración mínima bactericida (CMB) más elevada de los antimicrobianos (3;4). Este fenómeno fue bien documentado a nivel experimental por Chuard et al. a principios de los años 1990 utilizando un modelo animal de infección de cuerpo extraño por *S. aureus* (8). En concreto, bacterias recuperadas *ex vivo* presentaron un aumento de la CMB de los diferentes antibióticos de más de 100 veces por encima de su valor en fase planctónica. Además, estas bacterias *ex vivo* al ser expuestas a medios de cultivo *in vitro* con nutrientes convencionales recuperaban nuevamente su estado metabólico planctónico y su total sensibilidad a los mismos antibióticos. De esta forma, se demostró que el aumento de la CMB era un fenómeno reversible, expresión de una tolerancia fenotípica bacteriana en una determinada situación. Actualmente sabemos que este aumento de la CMB es un fenómeno universal, aunque no repercute en la misma medida en todos los antibióticos; así los más afectados en el caso de *S. aureus* son los aminoglucósidos, los betalactámicos y los glicopéptidos, mientras que las quinolonas y especialmente la rifampicina mantienen una mejor actividad (8;30-32). La tolerancia fenotípica determina un gran nivel de dificultad terapéutica, ya que los antibióticos no consiguen erradicar las bacterias del biofilm sino solo suprimirlas y al desaparecer su efecto, éstas son capaces de “despertar”, repoblar el biofilm y provocar una recaída de la infección.

Existen algunas formas fenotípicas bacterianas que tienen entidad propia como son las denominadas “Variantes bacterianas de colonia pequeña” (*Small colony variants*, SCV) y las bacterias persistentes. Las primeras fueron descritas en 1910, aunque su importancia clínica fue reconocida en la década de 1990 cuando se describieron estas variantes bacterianas de *S. aureus* como responsables de infecciones persistentes, recurrentes y con gran resistencia a los antibióticos (33;34). Estas SCV son bacterias de

crecimiento lento que precisan de una determinada sustancia específica para recuperar completamente su metabolismo; a este proceso de dependencia metabólica se le conoce como auxotrofismo. Actualmente se han destacado dos grupos de SCV: las que presentan un defecto en la síntesis de timidina (auxotróficas para timidina) y las que son deficientes en el transporte de electrones (auxotróficas para menadiona o hemina). Su identificación *in vitro* se caracteriza por su morfología pequeña y muestran una particular capacidad de supervivencia intracelular. Su importancia patogénica se ha confirmado en estudios recientes en pacientes con infecciones de prótesis articulares por *S. aureus* y recidiva de la infección (20;35).

Respecto a las formas particulares denominadas bacterias persistentes, fueron descritas en 1944 como bacterias que no se dividen (durmientes) y que son capaces de resistir elevadas concentraciones antibióticas (36). Estas bacterias persistentes pueden aislarse *in vitro* ya que se encuentran en mayor proporción en la fase estacionaria, y también se han identificado en el interior del biofilm bacteriano (37;38).

Como se comenta en el siguiente apartado, la deficiencia funcional de las células fagocitarias en las inmediaciones del cuerpo extraño, determina la presencia de un elevado porcentaje de bacterias de localización intracelular (22;39), cuya importancia en el mantenimiento y/o recidivas de estas infecciones tras la antibioterapia no está claramente establecida. Es sabido que las bacterias intracelulares presentan una serie de cambios fenotípicos que las hacen más resistentes a los antibióticos y que en esta localización se encuentran más protegidas frente a ellos (21;40;41). Así por ejemplo, en trabajos experimentales recientes se documentó que *S. aureus* en el interior de osteoblastos presentaba unos cambios en su morfología con un destacable engrosamiento de la pared bacteriana (42). De igual manera, es bien conocido que no todos los antibióticos penetran en el mismo grado en las células eucariotas y que las concentraciones alcanzadas y la actividad intracelular conseguida son variables y dependientes del antibiótico (43-45).

Además de las dificultades terapéuticas derivadas de las modificaciones fenotípicas mencionadas, el propio biofilm supone una barrera física a la acción antimicrobiana, en cuyo trayecto los antibióticos pueden ser inactivados o atrapados. Todos ellos se verán afectados, en mayor o menor medida, pero en grado variable

según sus características; así los antibióticos de elevado peso molecular tendrán mayores dificultades para su difusión y los betalactámicos serán particularmente susceptibles a las betalactamasas presentes en el biofilm (9;24).

Otro hecho limitante derivado del elevado número de bacterias en el biofilm es la competencia bacteriana y la selección de cepas genéticamente mejor dotadas, así como la transferencia horizontal entre bacterias de sus elementos genéticos. Por todo ello se pueden producir cepas mutantes, genéticamente distintas de las iniciales, con resistencia a diversos antibióticos.

2.3 Alteraciones funcionales de las células fagocitarias y del sistema inmunitario.

Las células fagocitarias en contacto con el cuerpo extraño sufren alteraciones en su funcionalidad que afectan tanto a su actividad fagocítica como bactericida. En este sentido, son especialmente destacables los trabajos experimentales de Zimmerli et al. de la década de 1980, llevados a cabo en un modelo de infección de cuerpo extraño por *S. aureus* en cobayas, en los que demostró que las células leucocitarias polimorfonucleadas con estos defectos funcionales eran incapaces de impedir el desarrollo de la infección y favorecían su mantenimiento. De esta forma se destacaba el papel responsable que podían tener estos macrófagos alterados en la mayor susceptibilidad para las infecciones en relación con los cuerpos extraños (22;39;46).

Por su parte, el papel correspondiente al sistema humoral en la prevención y tratamiento de las infecciones de cuerpo extraño no es bien conocido. Se considera que la presencia del biofilm dificulta la función de los anticuerpos ya que no pueden tener acceso a las bacterias incluidas en esta matriz glucoproteica (47).

3. *Staphylococcus aureus*

3.1 Características microbiológicas

Staphylococcus aureus es un coco grampositivo de 0,5 a 1,7 μm de diámetro que pertenece a la familia Micrococcaceae y al género *Staphylococcus*. Mediante distintas pruebas de laboratorio se diferencia de otras especies de dicho género (la más relevante de las cuales es *S. epidermidis*); así *Staphylococcus aureus* se caracteriza por ser: 1/ catalasa positivo; 2/ coagulasa positivo; y c/ fermentador de manitol (48;49).

El término *Staphylococcus* deriva de la expresión en griego *staphylé* (racimo de uvas) y es debido a su característico aspecto microscópico en racimos; aunque estos cocos pueden también disponerse en solitario o formando parejas o cadenas cortas. Presenta un rápido crecimiento en medios sólidos de cultivo no selectivos, cuyas colonias son betahemolíticas con una pigmentación amarillenta-dorada clásica (48).

Staphylococcus aureus coloniza habitualmente la piel humana y las fosas nasales, por lo que cualquier traumatismo sobre estas barreras físicas proporciona una puerta de entrada para el origen de una infección local y/o generalizada.

3.2 Patogenia y factores de virulencia

Staphylococcus aureus es un importante patógeno responsable de un gran número de infecciones en la población general y además, especialmente por la aparición de estafilococos multiresistentes, constituye un problema de primera magnitud en las infecciones nosocomiales. Posee diversos elementos que le proporcionan su extrema virulencia, tales como la pared celular, proteínas de membrana, enzimas y toxinas (49;50). También presenta la capacidad de invadir el interior de las células fagocíticas y no fagocíticas, y de permanecer viable en esta localización, por lo que podrá producir infecciones a distancia del foco inicial o bien ocasionar la recidiva de las infecciones estafilocócicas (21;42;51). Dispone de sistemas de regulación de estos mecanismos de virulencia que se activan en función de determinadas condiciones metabólicas y ambientales, actuando como mecanismo de control tipo “quorum-sensing”; entre éstos, el sistema *agr* (accessory gen regulator) es

el más conocido (26). En los últimos años numerosos estudios experimentales se han encaminado a relacionar la activación o inactivación de estos sistemas con su repercusión en la patogenia de la enfermedad estafilocócica. También se ha generado un interés creciente en la búsqueda y el desarrollo de sustancias (péptidos o fármacos) capaces de modular la respuesta de estos sistemas reguladores (52-54).

Las infecciones producidas por *S. aureus* muestran una gran diversidad de formas clínicas: infecciones de piel y partes blandas, bacteriemia y endocarditis, neumonías, infecciones relacionadas con catéteres y otros dispositivos no biológicos, etc. Debe destacarse el protagonismo del microorganismo como agente etiológico en las infecciones osteoarticulares (artritis, osteomielitis, espondilodiscitis, etc) y en las infecciones de implantes ortopédicos (3;48).

3.3 *S. aureus* en las infecciones de implantes ortopédicos

Tal como se indicó anteriormente, un 60% de las infecciones protésicas articulares son causadas por estafilococos, tanto *S. aureus* como estafilococos coagulasa negativos. Si bien los agentes etiológicos pueden variar en función de la epidemiología y del tipo de infección, hasta en el 25% de los casos podemos encontrar implicado a *S. aureus* (metecilín sensible o resistente). Su papel etiológico es especialmente importante en las formas clínicas de infección postquirúrgica precoz y hematógena, a las que confiere un peor pronóstico en comparación con otros agentes etiológicos (3;4).

En la mayoría de los casos los microorganismos responsables de infección alcanzan la prótesis en el mismo acto de su implantación en el quirófano o en el postoperatorio inmediato. La localización cutánea de *S. aureus* y su capacidad de adhesión a cuerpos extraños son factores que favorecen enormemente su papel patogénico en estas infecciones. *S. aureus* es también responsable de gran cantidad de episodios de bacteriemia que pueden colonizar la prótesis articular por vía hematógena; en este supuesto, el riesgo de que se produzca una colonización protésica en el curso de una bacteriemia por *S. aureus* se cifró en más del 30%, muy superior al observado en bacteriemias de otras etiologías (0,3%) (55).

3.4 Antibioterapia de las infecciones estafilocócicas asociadas a implantes ortopédicos

El papel de la antibioterapia en el tratamiento de las infecciones asociadas a implantes ortopédicos es determinante, pero como se ha indicado, requiere de la práctica concomitante de algún tipo de intervención quirúrgica (desbridamiento o retirada de la prótesis) para lograr la completa erradicación bacteriana. La precocidad en el inicio de este tratamiento combinado médico-quirúrgico es un elemento decisivo para el éxito final de curación de la infección protésica (3;17).

La antibioterapia con intención curativa comporta tratamientos de larga duración, que actualmente van desde los 3 meses en las infecciones de prótesis de cadera hasta los 6 en las de rodilla, recomendados de forma un tanto empírica ya que no existen estudios específicos al respecto (56;57). Las tasas de curación conseguidas con estas estrategias de tratamiento dependen sobretodo del tipo de infección; así en las infecciones postquirúrgicas tardías, tratadas con retirada de la prótesis, se puede alcanzar hasta el 90-95% de curación, mientras que en las infecciones hematógenas y posquirúrgicas precoces, tratadas con un desbridamiento quirúrgico y mantenimiento de la prótesis, se alcanza el éxito curativo en un 50-70% de los casos (3).

Los antibióticos deben ser seleccionados en función de su actividad en este contexto, ya que los criterios farmacodinámicos de eficacia habitualmente utilizados para las infecciones por bacterias en estado planctónico no son aplicables. En el caso de las infecciones de cuerpo extraño, el parámetro de eficacia más fiable parece ser el cociente área bajo la curva/concentración bactericida mínima en fase estacionaria (AUC/MBC_{estac}) (31;32). De esta forma, el tipo de microorganismo es un factor determinante en el pronóstico de la infección, que depende de la dualidad microorganismo responsable - antibioterapia disponible; así por ejemplo *S. aureus* y especialmente las cepas meticilín-resistentes, tienen peor pronóstico en comparación con otros agentes etiológicos como enterobacterias y estreptococos.

3.4.1 Rifampicina

Se considera el tratamiento antiestafilocócico de referencia en las infecciones de cuerpo extraño por sus características particulares: buena actividad intracelular y

frente a bacterias en fase estacionaria, y elevada penetración y difusión tisular. Su problema principal es el fácil y precoz desarrollo de resistencia bacteriana, por lo que no puede utilizarse en monoterapia.

El uso de rifampicina asociada a otros fármacos se ha mostrado altamente eficaz en estudios animales y en la práctica clínica; entre ellas, las combinaciones con quinolonas son las que demostraron mejores resultados y su asociación con betalactámicos y glucopéptidos son buenas alternativas. En cualquier caso, se considera que el papel primordial del tratamiento acompañante de rifampicina es evitar el desarrollo de resistencias (56-61).

La dosis de rifampicina más adecuada para el tratamiento de las infecciones protésicas estafilocócicas no está bien establecida y suele administrarse 600-900 mg/d. Se recomienda su uso en monodosis en ayunas en base a criterios farmacodinámicos de eficacia (4).

3.4.2 Fluoroquinolonas: ciprofloxacino y ofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino

Las fluoroquinolonas son los antibióticos considerados de elección para la combinación con rifampicina frente a las infecciones protésicas estafilocócicas en base a estudios de eficacia en animales y en humanos. Los trabajos clínicos disponibles son escasos, y son básicamente series de casos con un número limitado de pacientes, tratados con las fluoroquinolonas clásicas: ciprofloxacino y ofloxacino (56;59). Únicamente existe un estudio randomizado comparativo de eficacia de ciprofloxacino en combinación con rifampicina frente a ciprofloxacino en monoterapia que demostró los beneficios del tratamiento combinado y el efecto protector mutuo frente al desarrollo de resistencias (57).

Un punto destacable de esta asociación terapéutica es el efecto antagónico *in vitro* que ejerce rifampicina sobre la actividad de las fluoroquinolonas (62;63). Este hecho había sido bien descrito frente a bacterias en fase exponencial de crecimiento pero no se apreció frente a bacterias en fase estacionaria al utilizar ciprofloxacino como representante de las clásicas quinolonas (64). De igual forma, la relevancia clínica de este efecto antagónico no ha sido nunca apreciada en el contexto de las infecciones protésicas estafilocócicas.

Las nuevas fluoroquinolonas desarrolladas en los últimos años, levofloxacin y moxifloxacin, tienen una mayor actividad antiestafilocócica *in vitro* que ciprofloxacino u ofloxacino, en detrimento de su actividad frente a bacilos gram negativos. Estas nuevas quinolonas van incorporándose a la práctica clínica de las infecciones protésicas amparadas por los buenos resultados obtenidos con las quinolonas clásicas, pero su grado de eficacia no ha sido todavía contrastado. Así, recientemente se ha recomendado el uso de levofloxacin 750 mg/d más rifampicina como tratamiento electivo de las infecciones estafilocócicas protésicas (3;65;66).

3.4.3 Beta-lactámicos (cloxacilina) y glucopéptidos (vancomicina)

Tanto los antibióticos β -lactámicos como los glucopéptidos ejercen su actividad antimicrobiana sobre la pared bacteriana y son considerados agentes antiestafilocócicos bactericidas de referencia, cloxacilina frente a *S. aureus* metilín sensible y vancomicina frente a *S. aureus* metilín resistente. Su principal limitación en el tratamiento de estas infecciones es su escasa actividad frente a las bacterias estacionarias del biofilm, precisamente porque por su mecanismo de acción requieren que la bacteria se encuentre en fase replicativa (8;30-32). Un inconveniente adicional estriba en la necesidad de su administración por vía parenteral exclusivamente, en infecciones que requieren un tratamiento prolongado.

Por tanto, su papel principal en el tratamiento de estas infecciones sería el de proporcionar un efecto protector frente al desarrollo de resistencias a rifampicina. En esta función únicamente existen referencias esporádicas sobre la aparición de resistencia a rifampicina en la terapia combinada con vancomicina (quizás por un perfil farmacocinético diferente de ambos antibióticos), pero no con cloxacilina.

3.4.4 Nuevos antibióticos: linezolid

Linezolid es un antibiótico de reciente aparición, con un espectro de actividad selectivo frente a cocos gram positivos, considerado un agente bacteriostático y que presenta un margen de seguridad amplio frente al desarrollo de resistencias. Entre sus efectos secundarios destaca la aparición de toxicidad frente al sistema hematopoyético y el sistema nervioso, y esto limita su uso a dosis mayores de las recomendadas así

como su tratamiento prolongado. La eficacia clínica de linezolid ha sido demostrada en determinadas situaciones como infecciones de piel y partes blandas, y las neumonías por *S. aureus* resistente a meticilina asociadas a dispositivos de ventilación mecánica (67). Linezolid posee la ventaja de poder administrarse por vía oral con una excelente biodisponibilidad y presenta buena difusión tisular y en biocapas. Estas características le hacían especialmente atractivo para su uso en las infecciones protésicas, si bien la experiencia clínica en este ámbito es relativamente limitada (68;69). Su uso se ha centrado en las infecciones por SARM debido a las escasas alternativas terapéuticas.

4. MODELOS ANIMALES DE INFECCIÓN EXPERIMENTAL

4.1 Ventajas y limitaciones

Tras la realización de los estudios *in vitro* pertinentes, los modelos con animales de experimentación ofrecen la posibilidad de estudiar *in vivo* un fenómeno concreto y suponen un paso previo a los estudios clínicos en humanos.

En el caso de las enfermedades infecciosas, los modelos de investigación en animales han tenido históricamente una gran importancia para el estudio *in vivo* de los mecanismos patogénicos de las infecciones y su tratamiento. En este campo, tras la evaluación de la actividad antimicrobiana frente a un determinado microorganismo, la experimentación animal permite estudiar la eficacia de los antibióticos en su interacción con el sistema inmunitario. También en el ámbito de la antibioterapia, estos modelos animales permiten el estudio de nuevos fármacos en desarrollo (en cuanto a eficacia y seguridad), el estudio de mecanismos de resistencia a los antibióticos, etc. Otras ventajas de los modelos animales se relacionan con la reproducibilidad de los resultados, la posibilidad de estudiar un gran número de individuos o la cuantificación de unos parámetros objetivos (70-72).

Los animales utilizados con más frecuencia en estos estudios son ratones, ratas, cobayas y conejos. La elección final del animal dependerá de múltiples factores:

facilidad para el manejo del animal, susceptibilidad al agente infeccioso que se desea usar, coste del animal, reproducibilidad de la infección a estudio en el animal, ...

Al estudiar los antibióticos en animales hay que dar una gran importancia a las diferencias en la farmacocinética entre las especies. Globalmente, cuanto más pequeño es el animal, más acelerado es su metabolismo de los fármacos. De esta manera, en los últimos años ha ido aumentando el conocimiento sobre la farmacocinética y la farmacodinámica (PK/PD) de los antibióticos y se han mejorado los estudios para seleccionar aquellas dosis en animales que mejor representen las dosis utilizadas en humanos para cada antibiótico. Existen estudios en modelos animales de infección y ensayos clínicos en humanos que apoyan la idea de que los parámetros PK/PD de eficacia clínica y microbiológica son muy similares entre diferentes especies animales y el hombre (73;74).

En su contra, los modelos animales “simplifican” la infección que es objeto de estudio. La gran variedad en la sintomatología clínica de una enfermedad infecciosa (variaciones individuales, regionales, estacionales, etc) así como la complejidad de su evolución y pronóstico (en ocasiones impredecible), son reducidas a un modelo animal relativamente predecible y estandarizado.

Con todos estos matices hay que tener bien presente que los estudios en animales no deben nunca conducir a conclusiones de incorporación inmediata para el hombre, sino que deberían ser un elemento de base para la investigación clínica en humanos.

4.2 Modelo experimental de infección de cuerpo extraño en rata por *S. aureus*

Entre los modelos animales que reproducen este tipo de infecciones existen los que incorporan la implantación de prótesis en el animal, tanto ratas como conejos. Estos modelos reproducen la funcionalidad de la prótesis y las limitaciones por su infección, pero son muy complejos y comportan un elevado coste económico (70).

Otro modelo, que fue finalmente el escogido por nuestro grupo y la base del presente proyecto de investigación, es el de la infección de cajas de Teflón subcutáneas, desarrollado en ratas y cobayas (70). Se trata de un modelo ampliamente aceptado, descrito inicialmente en la década de 1980, que ha mostrado su utilidad para

reproducir una infección asociada a cuerpo extraño. Inicialmente fue descrito en cobayas y utilizado sobretodo en el estudio de la patogenia de esta infección, posteriormente se usó para evaluar la eficacia de algunos antibióticos en la profilaxis de la infección de cuerpo extraño y en ambos ámbitos consiguió aportar resultados relevantes. Cuando más adelante se quiso valorar la eficacia terapéutica de los tratamientos antibióticos se desarrolló el modelo en ratas, ya que estas toleran tratamientos más largos que las cobayas (más allá de 4 días). Este modelo en ratas también permitió incorporar en el estudio un cambio en la duración de la evolución natural de la infección antes del inicio del tratamiento antibiótico que pasó a ser de 2-3 semanas respecto a las 24-72 horas en el modelo en cobayas. Ambos modelos, realizados por dos grupos investigadores suizos distintos, centraron sus estudios en la infección estafilocócica (SAMS y SARM) y en los siguientes años coexistieron en la literatura aunque en la década de 1990 la mayor aportación de resultados se hizo con el modelo en ratas. Finalmente, los resultados obtenidos con este modelo fueron la base para estudios clínicos en humanos que concluyeron con el uso de rifampicina en el tratamiento de estas infecciones estafilocócicas (22;32;39;57;58;60;61;75).

Cuando nos propusimos desarrollar un modelo de infección de cuerpo extraño, nuestro objetivo principal era evaluar la eficacia terapéutica de distintos tratamientos antibióticos por lo que optamos por el modelo en ratas descrito por Lucet et al. (60). Este modelo reproduce una infección crónica (2-3 semanas de evolución), permite el tratamiento prolongado de los animales (entre 1 y 3 semanas), la evaluación local de la infección y la eficacia del tratamiento mediante el análisis del líquido de las cajas de Teflón. Obviamente sus limitaciones incluyen la localización subcutánea del cuerpo extraño y su ausencia de funcionalidad.

**JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO
E HIPÓTESIS DE TRABAJO**

I. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO E HIPÓTESIS DE TRABAJO

La infección de material protésico en Ortopedia y Traumatología supone un gran problema clínico desde el punto de vista del paciente y del sistema sanitario. Este tipo de infecciones son un reto terapéutico para el equipo médico en el que, en nuestro Hospital, participan diariamente cirujanos ortopédicos y médicos infectólogos. Al prever que las infecciones de material protésico continuarían siendo un problema sanitario de primera magnitud en los próximos años, se impulsó el diseño y la concepción del presente proyecto.

Los modelos animales de infección experimental son un instrumento de aproximación a los problemas clínicos ampliamente aceptados. Las ventajas que supone el estudio *in vivo* en animales como complemento adicional a los estudios *in vitro* son bien reconocidas ya que reproducen un entorno dinámico, fisiológico e inmunológico. De igual manera, estos modelos animales no están exentos de una serie de limitaciones si se pretende extrapolar sus resultados directamente a los problemas clínicos en humanos.

Al iniciar el proyecto consideramos que el modelo animal sería un método adecuado para conocer las posibilidades terapéuticas de mayor eficacia en el ámbito de las infecciones asociadas a cuerpo extraño; entre los modelos experimentales existentes concluimos que el desarrollado en ratas era ampliamente reconocido y adecuado. De las distintas opciones de tratamientos antibióticos convenimos estudiar aquellos antimicrobianos ya disponibles comercialmente de manera que los resultados que obtuviéramos pudieran ser fácilmente expuestos a la práctica clínica. En particular, centramos nuestro interés en confirmar el papel principal de rifampicina en la infección de cuerpo extraño estafilocócica, así como en comprobar si las nuevas fluoroquinolonas (en especial, levofloxacin) podrían aportar mayor eficacia a la terapia combinada con rifampicina que las clásicas ciprofloxacino u ofloxacino. Tuvimos también un especial interés en estudiar la eficacia de linezolid, un nuevo antibiótico que en el momento de

plantear nuestro trabajo se había utilizado con escasa experiencia en infecciones protésicas especialmente por estafilococos meticilín resistentes.

En concreto, planteamos las siguientes hipótesis de trabajo:

- i. Respecto al estudio de la eficacia de los diversos antibióticos y sus combinaciones en la infección asociada a cuerpo extraño, consideramos que las combinaciones antibióticas que incluyen rifampicina deberían ser las más activas frente a la infección por *S. aureus*. Los nuevos antibióticos como las modernas fluoroquinolonas y linezolid podrían suponer una aportación relevante en el tratamiento de estas infecciones.
- ii. La posible aplicación de los resultados obtenidos podría ser inmediata, teniendo en cuenta que los fármacos a utilizar están ya libremente comercializados. En este sentido, los resultados permitirían perfilar los protocolos terapéuticos pertinentes para ser asumidos en nuestro ámbito hospitalario particular y en el “Grupo de estudio de la patogenia y tratamiento antimicrobiano de la infección de la prótesis articular” constituido en el seno de la red de patología infecciosa (REIPI).
- iii. Finalmente, los resultados obtenidos conllevarían la conveniencia de proseguir con posteriores estudios para profundizar en el conocimiento de la patogenia y posibilidades terapéuticas de este tipo de infecciones.

OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

Primero: Desarrollar y estandarizar en nuestro medio un modelo experimental de infección de cuerpo extraño en rata.

Segundo: Estudiar y evaluar la eficacia comparativa de diversas monoterapias de tratamiento antiestafilocócico en la infección de cuerpo extraño.

Tercero: Estudiar la eficacia de las nuevas fluoroquinolonas y su relación con los parámetros farmacodinámicos.

Cuarto: Estudiar la eficacia de la combinación levofloxacino-rifampicina en la infección de cuerpo extraño por *S. aureus* sensible a meticilina.

Quinto: Estudiar la eficacia del linezolid solo y en combinación con rifampicina en la infección estafilocócica de cuerpo extraño.

MATERIAL Y MÉTODOS

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. SELECCIÓN DE LA CEPA BACTERIANA DE *S. aureus* METICILÍN SENSIBLE

Todos los estudios, *in vitro* e *in vivo*, se realizaron con la cepa *S. aureus* ATCC 29213. El Centro ATCC (American Type Culture Collection) es una entidad privada dedicada a la colección, preservación y distribución de microorganismos, así como de virus, sondas DNA, y células humanas y animales. La cepa se seleccionó, principalmente, por formar parte de esta colección ATCC por lo que podría ser fácilmente accesible para el nuestro y otros grupos de investigación a la hora de comparar resultados publicados en la literatura médica. Además, la cepa *S. aureus* ATCC 29213 cumplía con los requisitos imprescindibles de sensibilidad a los antibióticos que iban a ser estudiados.

2. AGENTES ANTIMICROBIANOS

Para los estudios *in vitro* se utilizó la sustancia purificada de cada antibiótico, resuspendida según las recomendaciones de sus respectivos laboratorios.

Para los estudios *in vivo* se usaron preparados comerciales con las convenientes diluciones para conseguir un volumen final adecuado para ser administrado a los animales.

Todos los antibióticos fueron facilitados generosamente por sus respectivos laboratorios: Levofloxacino (Aventis Pharma, Alemania), Moxifloxacino (Bayer, Alemania), Rifampicina (Aventis Pharma, España), Linezolid (Pfizer, España), Cloxacilina y Vancomicina (Normon, España).

3. ESTUDIOS *in vitro*

La actividad *in vitro* de los antibióticos fue evaluada mediante la determinación de CMI, CMB y la realización de curvas de letalidad en las dos fases del crecimiento bacteriano.

3.1 Fases exponencial y estacionaria del crecimiento bacteriano *in vitro*

Las bacterias en un medio de cultivo líquido sin restricción de nutrientes se multiplican a lo largo del tiempo de una forma bifásica, con una fase inicial de crecimiento exponencial seguida de otra de “no crecimiento” o estacionaria a la que se llega después de unas horas de multiplicación (en función de la cepa bacteriana) y se mantiene más allá de 24 horas si no existe lisis bacteriana espontánea (Figura IV.1)

Los estudios *in vitro* habituales se realizan de forma estandarizada con bacterias en fase exponencial. El interés por los estudios en fase estacionaria por nuestra parte vino dado porque en dicha fase las bacterias expresan tolerancia a los antibióticos que es una característica común con las bacterias implicadas en el biofilm. Por este motivo, trabajos precedentes apoyaban el uso de los resultados obtenidos con los estudios *in vitro* en fase estacionaria como un instrumento más útil para explicar los resultados obtenidos *in vivo* en las infecciones de cuerpo extraño (31;32).

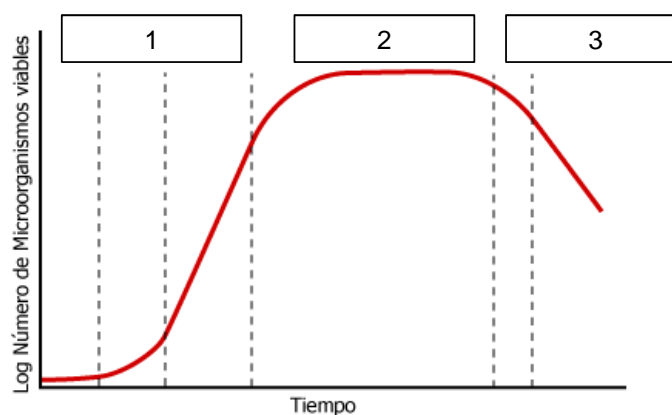


Figura IV.1. Esquema de las fases de crecimiento *in vitro* de las bacterias: 1, fase exponencial; 2, fase estacionaria; y 3, fase de lisis espontánea.

3.2 Estudios preliminares: influencia del inóculo bacteriano y del medio de nutrientes en la actividad bactericida de los antibióticos.

Formando parte del proceso de estandarización de los estudios *in vitro* en fase estacionaria, realizamos unos experimentos previos en los que evaluamos cómo la actividad bactericida de los antibióticos cloxacilina y levofloxacino se veía influenciada por el inóculo bacteriano elevado y la limitación de nutrientes, los dos elementos característicos de la fase estacionaria. Observamos que la actividad de ambos antibióticos fue máxima en condiciones estándar (fase exponencial, sin limitación en los nutrientes y con inóculo de 10^5 ufc/ml) y cómo la actividad bactericida disminuía tanto al utilizar inóculos bacterianos elevados como al limitar los nutrientes. Finalmente, la situación más exigente fue la de bacterias en fase estacionaria donde se utilizaban inóculos bacterianos de 10^8 ufc/ml y medio de nutrientes restrictivos expresándose mayor tolerancia a los antibióticos, aunque ésta no afectó igual a cloxacilina y a levofloxacino. En la Figura IV.2 se muestran resumidamente los resultados para ambos antibióticos.

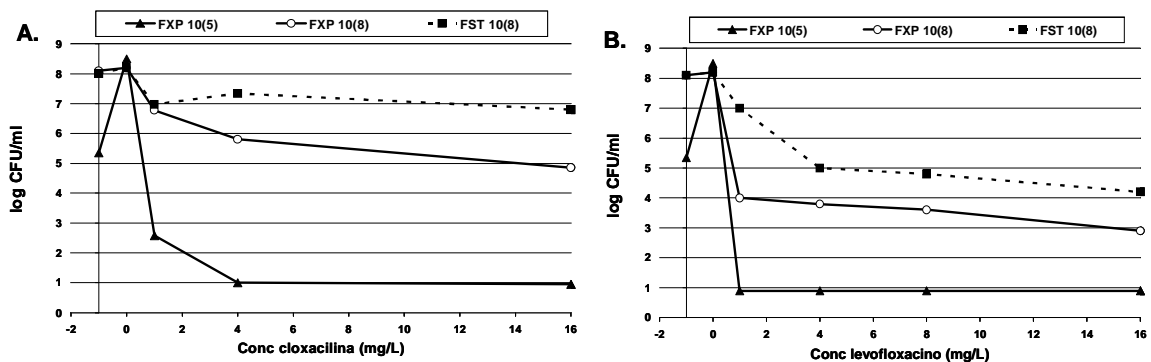


Figura IV.2. Influencia de los cambios en el tamaño del inóculo y la fase de crecimiento bacteriano en la actividad *in vitro* de cloxacilina (A) y levofloxacino (B). Abreviaciones: FXP, fase exponencial; FST, fase estacionaria; 10(5), inóculo 10^5 log CFU/ml; 10(8), inóculo 10^8 log CFU/ml.

3.3 Determinación de CMI y CMB.

Se estudió la CMI y CMB para todos los antibióticos con bacterias en fase exponencial siguiendo las recomendaciones del CLSI con el método de macrodilución (76), y también se determinó la CMB con bacterias en fase estacionaria de crecimiento. Se define como CMI aquella concentración mínima del antibiótico capaz de inhibir el crecimiento macroscópico de la bacteria, y como CMB a la concentración mínima del mismo capaz de erradicar el 99,9 % del inóculo inicial.

El método para estudiar *in vitro* bacterias en fase estacionaria no está tan claramente establecido, así que en nuestro caso estandarizamos una metodología previamente descrita con un sistema de macrodilución que se había mostrado útil para predecir los resultados de estudios *in vivo* de infección de cuerpo extraño (32). Para ello las bacterias se hicieron crecer en un medio de cultivo líquido más de 16 h para que alcanzasen la fase estacionaria, a continuación se centrifugaron y se resuspendieron en un medio restringido de nutrientes (PBS + 1% glucosa + 4% caldo Mueller-Hinton) a una alta densidad bacteriana (10^8 ufc/ml) en el cual permanecían estables y sin crecimiento remarcable más allá de 24 h. En esta situación las bacterias se exponían a distintas concentraciones de antibiótico (crecientes en orden 1:2) y se incubaban a 37° durante 24h para determinar la MBC.

3.4 Curvas de letalidad.

Se realizaron en fase exponencial y estacionaria para todos los antibióticos en solitario y para sus combinaciones con rifampicina.

En los estudios en fase exponencial, las concentraciones de antibiótico se escogieron entre un rango por encima y por debajo de la CMI ($128-0.5 \times \text{CMI}$) en base a los niveles séricos alcanzados en humanos con las dosis convencionales de cada antibiótico. Se siguieron las recomendaciones de la NCCLS, utilizando 10 ml de caldo Mueller-Hinton en los que se añadió un inóculo bacteriano (entre 5×10^5 y 5×10^6 UFC/ml) y una concentración determinada de antibiótico en solitario o en combinación con otro; estos tubos fueron mantenidos a 37° durante 24 h en una estufa con agitación continua (77). En este proceso se extrajeron muestras de los tubos en distintos puntos horarios (a las 0, 8 y 24 h del inicio) y se cultivaron para obtener recuentos cuantitativos

bacterianos a lo largo del tiempo. La actividad antimicrobiana del antibiótico se calculó para cada una de las concentraciones del mismo, solo o en combinación, a partir del descenso de recuentos bacterianos obtenidos al final del experimento.

Para los estudios en fase estacionaria se utilizaron, generalmente, concentraciones de antibiótico mayores que en fase exponencial debido al fenómeno de tolerancia antibiótica, y éstas correspondían a los niveles alcanzados en el líquido de las cajas en el pico (concentración máxima), en el valle (concentración alcanzada previa a la administración de la siguiente dosis) y en un nivel intermedio entre ellos. En todos los casos, estas concentraciones correspondieron a niveles alcanzables en suero de humanos. En estas curvas de letalidad se utilizó el medio restrictivo de nutrientes con inóculos bacterianos altos (10^8 ufc/ml) comentado anteriormente y el resto del proceso siguió la metodología de las curvas en fase exponencial incubándose a 37° durante 24 h y realizando recuentos bacterianos cuantitativos a las 0, 8 y 24 horas del experimento.

La actividad del antibiótico, en ambas fases de crecimiento, fue definida como bactericida cuando conseguía erradicar el 99,9 % del inóculo inicial (esto es, un descenso en el recuento bacteriano final ≥ 3 log cfu/ml). En los estudios de actividad de las combinaciones de antibióticos se definió como efecto sinérgico el aumento ≥ 2 log ufc/ml en la letalidad de la combinación respecto al antibiótico en solitario más activo, indiferencia como un cambio menor de 2 log (aumento o descenso) y antagonismo como un descenso en la letalidad de la combinación ≥ 2 log. Todos los experimentos fueron realizados, como mínimo, por duplicado.

3.5 Determinación de la concentración preventiva de mutantes (CPM) de las fluoroquinolonas

La concentración preventiva de mutantes (CPM, adaptación de su acrónimo anglosajón MPC, "Mutant prevention concentration") es aquella concentración mínima de antibiótica capaz de inhibir el crecimiento de bacterias mutantes resistentes presentes en un alto inóculo bacteriano. En los últimos años los estudios de la CPM han sido desarrollados ampliamente con las fluoroquinolonas porque las bacterias desarrollan resistencia a ellas mediante un proceso secuencial de mutaciones genéticas; en el caso de *S. aureus* las mutaciones en *parC* (gen que codifica la subunidad de

topoisomerasa IV) aparecen primero y en un segundo paso lo hacen en *gyrA* (gen que codifica la girasa). La presencia de una doble mutación genética espontánea es rara, ocurriendo con unas frecuencias $> 1 \times 10^{-12} - 10^{-16}$, por lo que es más determinante la existencia de una primera mutación (que ocurre con frecuencias menores) ya que puede afectar la actividad de las quinolonas y favorecer la aparición de la segunda mutación. El interés por el estudio *in vitro* de la CPM con altos inóculos (10^{10} UFC/ml) viene dado por permitir la detección de cepas resistentes en una población amplificada (78-80).

Las CPMs se determinaron siguiendo la metodología previamente descrita en la literatura (80). Para ello se hicieron diversas placas de agar (MHA, BECTON-DICKINSON) a las que se añadió una concentración conocida de antibiótico (diferente en cada placa, según un orden creciente respecto de la previa) y sobre ellas se añadió un alto inóculo de *S. aureus* (10^{10} UFC/ml) obtenido después del crecimiento en caldo de cultivo Mueller-Hinton durante 24h, centrifugado y convenientemente diluido. Las placas con el inóculo fueron incubadas a 37° durante 48h; se definió la CPM como la mínima concentración de antibiótico que prevenía el crecimiento macroscópico de bacterias. Se determinaron las CPMs de levofloxacino (con placas de agar que contenían concentraciones de 0,5; 0,6; 0,8 y 1 $\mu\text{g/ml}$) y moxifloxacino (con 0,12; 0,25; 0,5 y 1 $\mu\text{g/ml}$).

4. ESTUDIOS TERAPÉUTICOS EN ANIMALES

4.1. Metodología para la estandarización del modelo experimental de infección de cuerpo extraño

El estudio fue aprobado por el Comité Ético para la Experimentación Animal (CEEAA) de la Universitat de Barcelona y del DARP de la Generalitat de Catalunya. El modelo está basado en el descrito por Lucet *et al.* en ratas macho Wistar con un peso aproximado de 200-225 g. al inicio del experimento, que fue mínimamente modificado por utilizar un menor número de cajas de Teflón en cada rata (60). Los animales fueron alojados en las instalaciones del Estabulario del Campus de Bellvitge durante todo el experimento y tuvieron acceso a comida y agua *ad libitum*.

Los elementos y procedimientos necesarios para la realización del modelo son detallados a continuación:

1/ *Cajas de Teflón y piezas de metacrilato.* Las cajas de Teflón son cilíndricas, están multiperforadas con 150 agujeros de 1 mm de diámetro y tienen las siguientes medidas: 30 mm de largo, 12 mm de diámetro externo y 10 mm de diámetro interno; en cada extremo se cierran con una tapa que presenta un agujero de 2 mm de diámetro por el que se puede acceder al interior de la caja mediante una punción con aguja. Las piezas de metacrilato (7x7x1 mm) se introducen en número de dos en el interior de cada caja de Teflón antes de cerrarla con la tapa. Todo este material no lo encontramos comercializado por lo que una empresa local (Mecanizados El Besós, S. Adrià del Besós) las fabricó especialmente en base a las indicaciones que les realizamos. En la Figura IV.3 se muestra una fotografía de una caja de Teflón.

2/ *Anestesia, analgesia y sacrificio de los animales.* Los anestésicos, ketamina (80 mg/kg; Ketolar 50, PFIZER) y xilacina (10 mg/kg; Rompun 2 %, BAYER), se administraron intraperitonealmente cuando los animales iban a ser sometidos a cirugía. Se utilizó anestesia inhalada con isoflurano (Forane, ABBOTT) para los procedimientos de obtención de muestras. La analgesia requerida para el postoperatorio se administró mediante una inyección única intraoperatoria de buprenorfina s.c. (0,01 mg/kg, Buprex, SCHERING-PLOUGH). El sacrificio de los animales se realizó mediante la inyección

intracardíaca de una sobredosis de pentotal (Tiobarbital, BRAUN) con el animal previamente anestesiado.

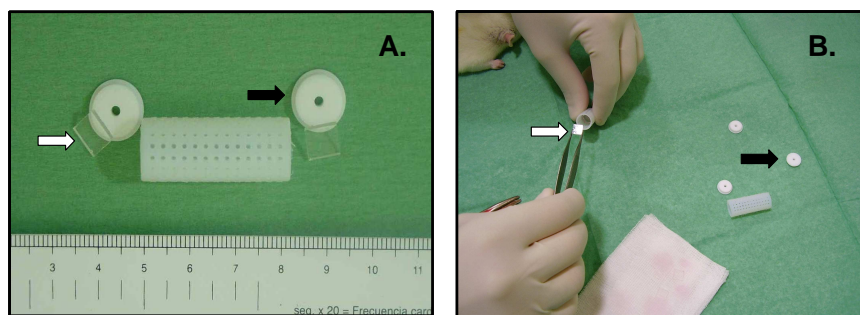


Figura IV.3. Fotografías de la caja de Teflón y sus diferentes elementos (tapas de las cajas y piezas de metacrilato con flechas negras y blancas, respectivamente) en las que se aprecia su tamaño (A) y su montaje en el momento de implantarse en el animal (B).

3/ *Inóculo bacteriano.* La preparación del inóculo bacteriano se realizó siempre en el Servicio de Microbiología del HUB de acuerdo con el siguiente protocolo: a partir de alícuotas congeladas (a -70°C) se realizaba un pase a una placa de TSA 5% de la cepa de *S. aureus* y se incubaba a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, algunas colonias se resuspendían en caldo TSB haciéndolas crecer durante 4-6 h a 37°C para luego centrifugarlas y resuspenderlas en suero fisiológico hasta ajustarse a una densidad óptica equivalente al inóculo necesario ($0,2 \times 10^6$ a 2×10^6 ufc/ml).

4.2. Obtención y procesamiento de las muestras

Todos estos procedimientos fueron realizados de acuerdo a la metodología descrita con el modelo experimental inicial, ya que se había mostrado adecuada para mantener la viabilidad de las bacterias durante su procesamiento (8;60).

i/ Líquido del interior de las cajas de Teflón (TCF).

Mediante una punción transcutánea se recuperaban unos 0,2-0,4 ml de líquido de las cajas que se sometían a un proceso de sonicación mediante un baño de ultrasonidos (150 W durante 1 min, BRANSON 5510; AFORA) para minimizar la agregación celular. Este líquido procesado se utilizó para realizar recuentos bacterianos del mismo y para el estudio de resistencias. En el primero de los casos, 100 μl de las

muestras del TCF y de las posteriores diluciones 1:10 se sembraban en placas de TSA sangre, se incubaban a 37°C durante 48 h y se obtenía así los recuentos cuantitativos bacterianos que se expresaron en forma de log UFC/ml (límite detección 10 UFC/ml).

ii/ Piezas de metacrilato del interior de las cajas de Teflón.

Las piezas recuperadas se introducían en un tubo de ensayo con 1 ml de PBS para un “lavado mecánico” (utilizando vórtex) y se pasaban a un nuevo tubo con PBS para repetir este procedimiento 2 veces más. A continuación se colocaban las PM en otro tubo con 1 ml de PBS con tripsina (6 U/ml; Trypsin 500 mg, SIGMA) durante 20 min a 37°C para su digestión enzimática (“proceso de tripsinización”) y finalmente, se recuperaba el líquido del procesamiento, se sonicaba (150 W, 1 min) y se utilizaba para realizar recuentos bacterianos (siguiendo la misma metodología descrita antes) y para el estudio de resistencias.

iii/ Sangre mediante punción intracardíaca.

Este procedimiento fue utilizado para los estudios de farmacocinética y para el sacrificio final; para ello se anestesiaba el animal con isoflorano inhalado y se realizaba la punción intracardíaca con una aguja 25G para extraer una muestra de 0,3ml de sangre o bien inyectar una dosis letal de tiopental.

4.3 Diseño experimental del modelo de infección de cuerpo extraño en rata: protocolo esquemático

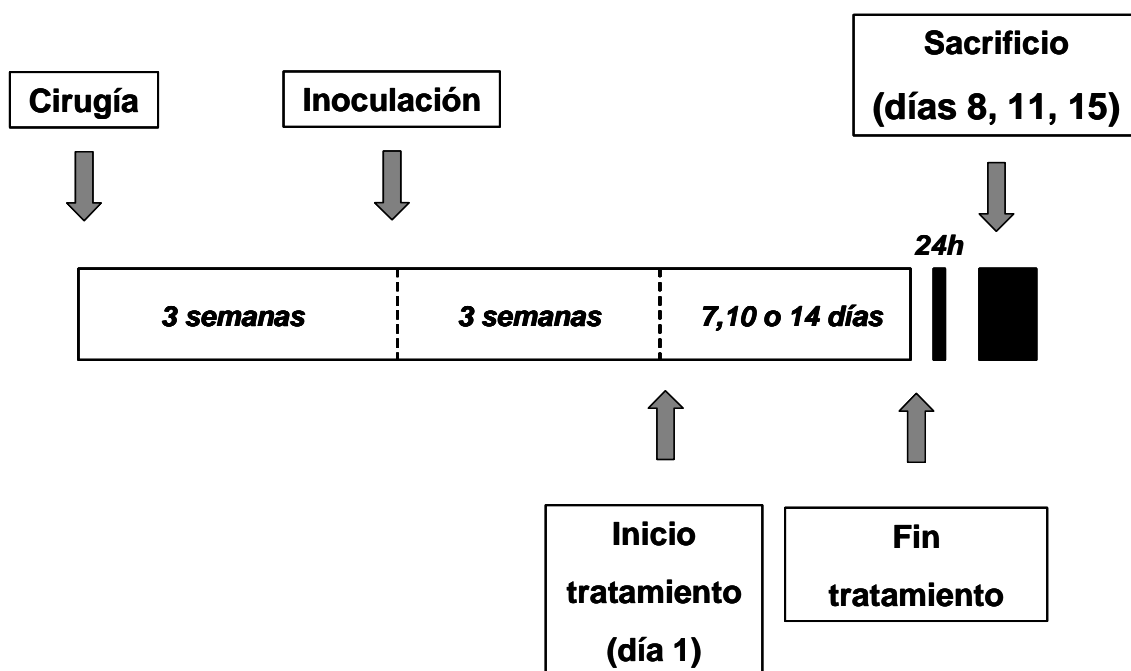


Figura IV.4. Esquema del diseño experimental del modelo de infección de cuerpo extraño por *S. aureus* en rata.

Los sucesivos pasos del diseño experimental del modelo se resumen a continuación y se representan esquemáticamente en la Figura IV.4.

1/ Cirugía. Se implantaban las dos cajas de Teflón, con las piezas de metacrilato en su interior, en el lomo de los animales.

2/ Inoculación. Después de 3 semanas de la cirugía la herida estaba totalmente cicatrizada y se procedía a la inoculación bacteriana en el líquido de las cajas; previamente se comprobaba la esterilidad del líquido para excluir de los estudios terapéuticos aquellas en las que se detectara algún tipo de crecimiento.

3/ Inicio del tratamiento (día 1). Tres semanas después de la inoculación se inició el tratamiento previa obtención de muestras del líquido para tener los recuentos bacterianos iniciales. Se definió un recuento mínimo de 5 log CFU/ml para que la

muestra fuera incluida en los estudios terapéuticos; se excluía un animal solo si ambas cajas tenían recuentos bacterianos por debajo de este recuento. Los animales fueron aleatorizados para incluirse en el grupo control o en los distintos grupos terapéuticos.

4/ Tratamiento. Se administró intraperitonealmente; se mantuvo durante 7, 10 o 14 días en función del estudio de eficacia que se diseñó para cada pauta terapéutica.

5/ Fin del tratamiento. A las 24 h de finalizar el tratamiento (para minimizar el efecto de persistencia del antibiótico) se obtuvo líquido de las cajas para realizar el recuento final cuantitativo de bacterias, se sacrificaron los animales y se recuperaron las piezas de metacrilato (Figura IV.5). Según la duración del tratamiento, se denominó a este punto final como día 8, 11 o 15.

6/ Evaluación de la eficacia terapéutica. Se evaluó mediante el descenso en los recuentos bacterianos entre el inicio y el final del tratamiento ($\Delta \log \text{ufc/ml}$). También se estudió en algunos casos la eficacia mediante la cuantificación de bacterias en las piezas de metacrilato.

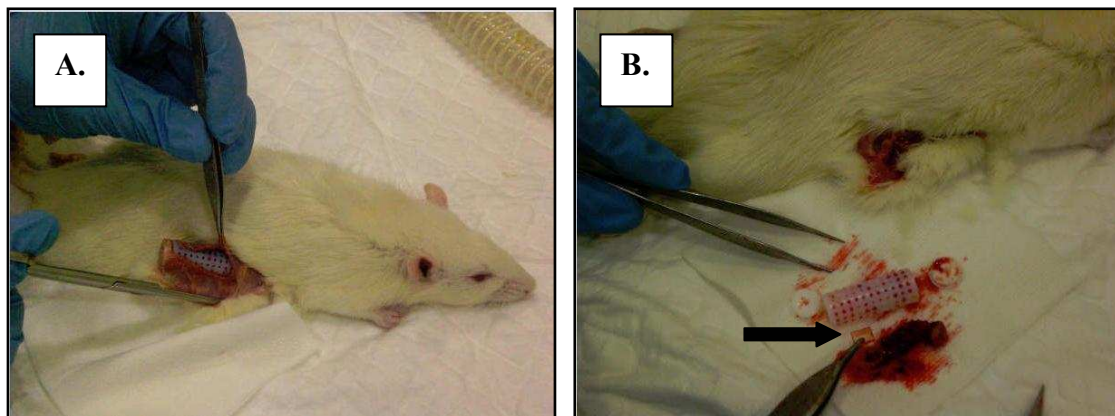


Figura IV.5. Fin del tratamiento antibiótico. A: una vez sacrificado el animal, se disecciona la piel y el tejido subcutáneo para la extracción de las cajas de Teflón. B: recuperación de las piezas de metacrilato (flecha negra) del interior de las cajas.

5. ESTUDIOS DE FARMACOCINÉTICA

Los estudios de farmacocinética fueron realizados antes de iniciar los experimentos terapéuticos con el objetivo de seleccionar la dosis de antibiótico a administrar a los animales que fuera equivalente a las dosis utilizadas en humanos.

5.1 Metodología

Se utilizaron ratas no infectadas a las que se les administró una dosis única (ajustada por peso) del antibiótico a estudio y posteriormente se obtenía una muestra de sangre (300-400 μ l) y del líquido de las cajas (300 μ l) en varios puntos horarios seleccionados (no menos de 6 en cada caso); estas muestras se centrifugaban y el suero y líquido resultantes se congelaban a -70° hasta su análisis. En cada punto horario se usaron 4 animales que pudieron ser utilizados en 2 o 3 puntos horarios para minimizar el número total de animales usados; así, para cada una de las pautas antibióticas se trabajó con unas 10 ratas.

En algunos casos las dosis de antibiótico estudiadas fueron basadas en estudios farmacocinéticos en ratas previamente publicados; en otros casos se realizaron múltiples ensayos con diferentes dosis. Debido al tratamiento prolongado del modelo, con la dosis final seleccionada se realizó también una determinación de las concentraciones de antibiótico del día 4^o del experimento terapéutico obtenidas en el valle (momento previo a la dosis siguiente) y en el pico posterior (concentración máxima después de esa dosis).

5.2. Determinación de niveles de antibiótico

Se realizó con la técnica de bioensayo por difusión en agar en todos los casos excepto para vancomicina, en el que se utilizó la técnica de inmunoensayo de fluorescencia polarizada.

En el método de bioensayo se prepararon unas placas con medio de cultivo adecuado (Antibiotic medium N^o 1, DIFCO) y una proporción de microorganismo, seleccionado por su sensibilidad al antibiótico que se quería analizar (81). En esas placas se colocaron unos discos de celulosa impregnados con una concentración

conocida de antibiótico a testar, en el caso de las placas que servían de patrón de referencia, y después de unas horas de incubación se determinaron los halos de inhibición del crecimiento del microorganismo para obtener una recta de regresión que relacionara el tamaño del halo de inhibición con la concentración de antibiótico. Para analizar las muestras problema que provenían de los experimentos y contenían una concentración de antibiótico desconocida, se impregnaban los discos de celulosa con esas muestras y se infería el tamaño del halo a la recta de regresión patrón y así se determinaba la concentración de antibiótico. La técnica de bioensayo permitió determinar las concentraciones de antibiótico libre, no unido a proteína. Para cada uno de los antibióticos, los microorganismos utilizados y los límites de detección fueron los siguientes:

- *S. epidermidis* ATCC 27626 para rifampicina (límite inferior 0,25 µg/ml; linealidad del ensayo r^2 0,98)
- *S. aureus* ATCC 29213 para cloxacilina (límite inferior 1 µg/ml; linealidad del ensayo r^2 0,98) y moxifloxacino (límite inferior 1 µg/ml; linealidad del ensayo r^2 0,99)
- *E. Coli* ATCC 25922 para levofloxacino (límite inferior 0.5 µg/ml, linealidad del ensayo r^2 0.99)
- *B. subtilis* ATCC 12432 para linezolid (límite inferior 2 µg/ml; linealidad del ensayo r^2 0,97)

La determinación de concentraciones de vancomicina (límite de detección 2 µg/ml) se llevó a cabo mediante la técnica de inmunoensayo de fluorescencia polarizada (IFP) con un aparato analizador TDx y los necesarios reactivos, controles y calibradores (ABBOTT CIENTIFICA S.A., Madrid, España). Para determinar el porcentaje de unión a proteínas *in vivo* de vancomicina en el líquido de las cajas de las ratas se utilizó un sistema de ultrafiltración mediante centrifugado (Centrifree; MILLIPORE CORP., Bedford, Mass.); para ello se analizaron las muestras de líquido de las cajas que contenían vancomicina con previo ultrafiltrado y sin él para separar la porción de antibiótico no unido a proteínas y se usaron muestras de vancomicina en PBS como controles de antibiótico libre (61).

5.3. Selección de las dosis de antibiótico: criterios razonables farmacocinéticos y farmacodinámicos

Una vez finalizados los estudios de farmacocinética, con los valores de las concentraciones de antibiótico en los distintos puntos horarios se construyeron gráficas de concentración-tiempo para cada uno de los antibióticos con la ayuda de una aplicación informática (PK Functions for Microsoft Excel. Usansky, J. I., Desai, A. and Tang-Liu, D. Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan, Irving, CA 92606, USA).

Se calcularon los siguientes parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos tanto en sangre como en el líquido de las cajas: concentración máxima o pico (C_{max}), vida media ($t_{1/2}$), constante de eliminación (K), área bajo la curva (AUC, en relación a la gráfica concentración-tiempo), $T > CMI$ (tiempo durante el cual la concentración de antibiótico se mantiene por encima de la CMI), C_{max}/CMI (relación entre la concentración pico y la CMI) y el cociente AUC/CMI .

Finalmente, en base a conocimientos previos se seleccionaron aquellas dosis en las ratas que aseguraran unos parámetros farmacocinéticos similares a los conseguidos en suero de humanos con las dosis habituales. La particularidad de nuestro modelo animal residía en el hecho de la existencia de dos compartimentos (suero y líquido de las cajas). La relación existente entre las concentraciones de los compartimentos sérico y el de los fluidos extravasculares es bien conocida y se caracteriza por: 1/ la concentración pico en suero es mayor respecto al compartimento extravascular; 2/ la concentración de antibiótico se elimina más tardíamente en el compartimento extravascular por lo que el $T > CMI$ es mayor que en suero; y 3/ el AUC de ambos espacios es similar (74;82-84). Por este motivo, se seleccionaron aquellas dosis en animales que aseguraban una AUC en el líquido de las cajas equivalente a la conseguida en suero de los humanos; este criterio fue aplicado para todos los antibióticos excepto para cloxacilina ya que el parámetro farmacodinámico que mejor se relaciona con su eficacia es el $T > CMI$ y así los mayores valores de $T > CMI$ en el líquido de las cajas permitieron una dosificación más espaciada de lo que suele ser habitual en las ratas.

5.4. Grupos terapéuticos

Todas las pautas terapéuticas estudiadas, incluyendo monoterapias y combinaciones de antibióticos, se indican a continuación junto con la dosis equivalente en humanos para cada dosis del animal.

Grupo terapéutico (Ratas)	Dosis equivalente en humanos
Cloxacilina 200 mg/kg/12 h	2 g/4h
Levofloxacino 50 mg/kg/24 h	500 mg/d
Levofloxacino 100 mg/kg/24 h	750-1000 mg/d
Moxifloxacino 40 mg/kg/24 h	400 mg/d
Moxifloxacino 80 mg/kg/24 h	800 mg/d
Linezolid 35 mg/kg/12 h	600 mg/12 h
Vancomicina 50 mg/kg/12 h	1 g/12 h
Rifampicina 25 mg/kg/12 h	900 mg/d
Cloxacilina + Rifampicina	
Levofloxacino 50 + Rifampicina	
Levofloxacino 100 + Rifampicina	
Linezolid + Rifampicina	
CONTROL (suero fisiológico)	

6. ESTUDIOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

Se realizaron dos tipos de estudios para comprobar el desarrollo de resistencias a determinados antibióticos durante los experimentos terapéuticos en animales.

6.1 Detección de cepas resistentes en placas de agar con antibiótico

Para este método se prepararon placas de agar (MHA, BECTON-DICKINSON) con una concentración de antibiótico conocida y se conservaban en la cámara frigorífica (5 °C) como máximo entre 7 y 10 días para preservar la actividad del antibiótico. Las muestras del líquido de las cajas y del obtenido del procesamiento de las piezas de metacrilato (100 µl en ambos casos) se inocularon sobre las placas con antibiótico y se incubaron a 37° durante 48 h. Los resultados se interpretaron cualitativamente como positivos (cualquier crecimiento macroscópico de colonias de *S. aureus* sobre las placas) o bien como negativos (ausencia de crecimiento macroscópico).

Los antibióticos estudiados mediante este método, con las respectivas concentraciones de fármaco que se añadían a las placas, fueron:

- rifampicina, placas con 1 µg/ml
- levofloxacino, placas con 1 µg/ml
- moxifloxacino, placas con 1 µg/ml
- linezolid, placas con 4 µg/ml

6.2 Estudio de poblaciones bacterianas

Este método se llevó a cabo exclusivamente para el estudio de muestras de líquido de las cajas obtenidas al final del tratamiento con levofloxacino. Se siguieron los procedimientos metodológicos descritos en la literatura para los que se necesitaron placas de agar con concentraciones conocidas crecientes de antibiótico, que se realizaron tal como se indicó en el apartado de determinación de CPMs (85). Las muestras recuperadas *ex vivo* de los animales tratados con levofloxacino se hicieron crecer durante 24h en caldo de cultivo Mueller-Hinton y después se centrifugaron, se resuspendieron hasta conseguir un inóculo de 10¹⁰ ufc/ml y se incubaron en las placas durante 48h a 37°. El crecimiento de microorganismos fue cuantificado al final del

experimento y se calculó la frecuencia de mutantes para una determinada concentración de antibiótico como el número de bacterias mutantes crecidas respecto del total de inóculo inicial. Se procedió de igual forma con un inóculo elevado de *S. aureus* de la cepa original ATCC 29213 para comparar la frecuencia de mutantes en ésta y la cepa recuperada *ex vivo*.

7. ESTUDIOS ESTADÍSTICOS

Los recuentos bacterianos fueron expresados en forma de log ufc/ml (medias \pm desviación estándar). Se comprobó la distribución normal de los datos relativos a los recuentos bacterianos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias en los recuentos bacterianos entre grupos terapéuticos y controles se compararon mediante el Análisis de la Varianza (ANOVA). El test de T Student no apareado con la corrección de Bonferoni se utilizó para determinar la significación estadística. El test del Análisis de la Co-Varianza (ANCOVA) se utilizó para comparar diferencias entre recuentos bacterianos de un mismo grupo de tratamiento evaluados en diferentes días. Para los estudios de correlación entre dos variables cuantitativas se utilizó el coeficiente de Pearson.

En todas las pruebas se consideró estadísticamente significativo un valor $< 0,05$.

RESULTADOS

V. RESULTADOS (por objetivos)

OBJETIVO PRIMERO.

Desarrollar y estandarizar en nuestro medio un modelo experimental de infección de cuerpo extraño en rata.

Artículo 1. O. Murillo, A. Domenech, A. Garcia, F. Tubau, C. Cabellos, F. Gudiol, J. Ariza. "Efficacy of high doses of levofloxacin in experimental foreign-body infection by methicillin-susceptible *S. aureus*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2006; 50:4011-4017.

Artículo 2. O. Murillo, ME. Pachón, G. Euba, R. Verdaguer, M. Carreras, C. Cabellos, J. Cabo, F. Gudiol, J. Ariza. "Intracellular antimicrobial activity appearing as a relevant factor in the antibiotic efficacy against an experimental foreign-body infection by *S. aureus*." In review.

Los aspectos fundamentales de estudio y sus resultados se resumen en los apartados siguientes:

- 1.a/ Estandarización del modelo animal.
- 1.b/ Reproducción de las características particulares de la infección de prótesis articular.
- 1.c/ Estudios de farmacocinética-farmacodinámica.

1.a/ Estandarización del modelo animal.

Algunos resultados de este primer objetivo que se refieren a la metodología utilizada han sido detallados en la sección “Material y Métodos”, y también fueron mencionados brevemente en los Artículos 1 y 2.

Respecto a resultados concretos de la estandarización de los distintos procedimientos del modelo, cabe destacar:

i/ Proceso quirúrgico. Se llevó a cabo con el animal anestesiado; se rasuró y desinfectó el lomo (con povidona yodada y alcohol) y se realizó una incisión en la zona estéril de unos 2 cm de largo para, a continuación, diseccionar el espacio subcutáneo e introducir longitudinalmente dos cajas de Teflón (una en cada lado) que contenían dos piezas de metacrilato en su interior (Figura V.1). La herida se cerró después con puntos de sutura de seda absorbible y se desinfectó con povidona yodada; se produjo una correcta cicatrización durante la primera y segunda semana posterior a la intervención. El número de cajas que se colocó en cada animal fue finalmente dos ya que implantando 3 ó 4 se producía la expulsión de la mayoría de ellas a lo largo del experimento, probablemente por una peor adaptación del animal al cuerpo extraño. A pesar de las medidas de asepsia utilizadas, sobretudo en los inicios de nuestro estudio en algunos casos se produjo la infección de las cajas en las semanas que seguían a la cirugía y este hecho fue limitándose conforme tuvimos mayor experiencia con el proceso.

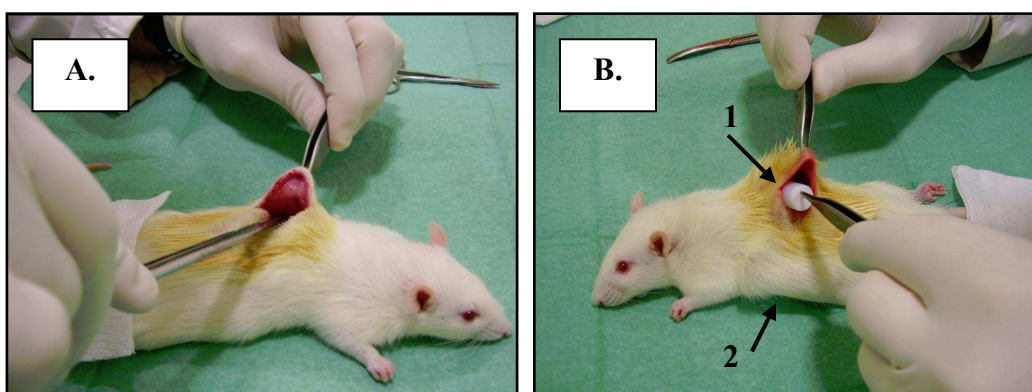


Figura V.1. Proceso quirúrgico. A: disección del espacio subcutáneo. B: introducción de las dos cajas de Teflón, una a cada lado del lomo del animal (se muestran numeradas para apreciarlas mejor).

ii/ Obtención de muestras del líquido de las cajas e inoculación. Se obtuvo el líquido mediante una punción transcutánea con una aguja de 23G a través del agujero de una de las tapas de la caja de Teflón; esto no supuso ninguna dificultad especial ya que se podía palpar bien la caja en posición subcutánea (Figura V.2). De la misma manera accedíamos al interior de las cajas para producir la infección inoculando 0,1 ml de $0,2 \times 10^6$ a 2×10^6 UFC/ml de *S. aureus* ATCC 29213, previa comprobación de la esterilidad del líquido. Las dificultades más limitantes fueron la contaminación del líquido de las cajas (tal como se ha indicado antes) y el conseguir una infección estable en el tiempo. Sobre esto último, destacamos que para incluir las muestras en los estudios terapéuticos se exigió un recuento bacteriano mínimo a las 3 semanas de la inoculación (5 log UFC/ml) porque era el que se había mostrado estable hasta 4 meses después.

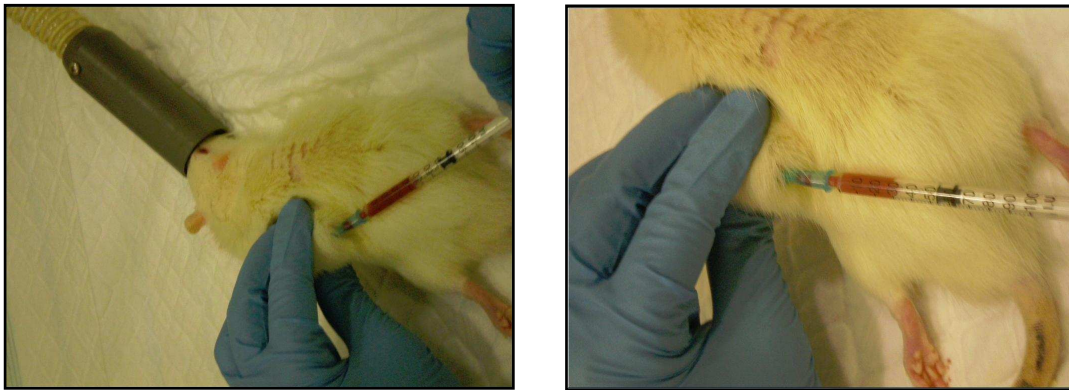


Figura V.2. Extracción del líquido de las cajas mediante punción transcutánea a través del agujero de una de sus tapas.

iii/ Expulsión espontánea de cajas de Teflón durante el experimento terapéutico. Fue quizás el hecho más limitante, producido bien por problemas relacionados con la cirugía (sobreinfección o mala adaptación “mecánica” de las cajas) o bien por la evolución de la propia infección de cuerpo extraño que ocasionaba un absceso subcutáneo con la consiguiente fistulización.

Una vez tuvimos adecuado el modelo, aproximadamente un 20% de las cajas se perdían para los experimentos terapéuticos bien por recuentos bacterianos insuficientes o por fistulización.

1.b/ Reproducción de las características particulares de la infección de prótesis articular.

Formando también parte del proceso de estandarización del modelo, analizamos y comprobamos hasta qué punto se reproducían elementos característicos de la infección de cuerpo extraño:

i/ Persistencia de la infección estable en el tiempo.

Analizamos la evolución de los recuentos bacterianos en el líquido de las cajas durante las 5 semanas después de la inoculación y observamos un ligero descenso en la primera semana, la posterior recuperación de los recuentos iniciales a partir de la segunda y la persistencia de la infección estable hasta el último día analizado que incluyó el período de tratamiento antibiótico máximo que utilizamos. Estos resultados se mostraron en el apartado de metodología del Artículo 1, y se representan gráficamente en la Figura V.3.

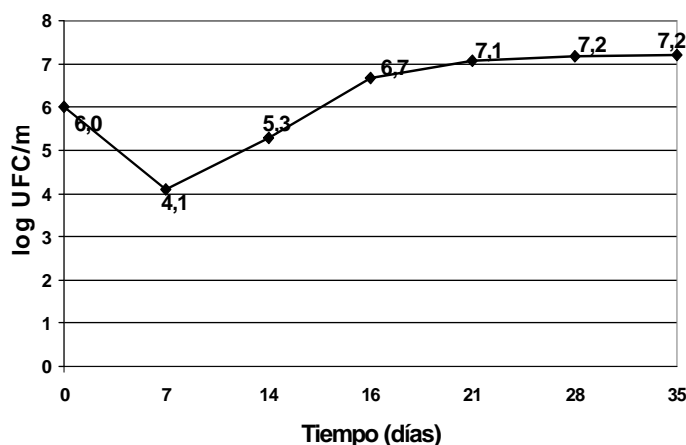


Figura V.3. Evolución en el tiempo de los recuentos bacterianos de líquido de las cajas. Datos expresados en media de log UFC/ml.

ii/ Tolerancia antibiótica de las bacterias en contacto con el cuerpo extraño

Se determinó la CMB en las bacterias recuperadas *ex vivo* del líquido de las cajas y se comparó con el valor obtenido *in vitro* en los estudios convencionales para la cepa de estudio *S. aureus* ATCC 29213. El resultado para cloxacilina fue CMB > 256 µg/ml (*ex vivo*), frente a CMB de 1 µg/ml (*in vitro*).

iii/ Presencia de biofilm macroscópico

Se sacrificaron algunos animales después de la inoculación del líquido de las cajas y comprobamos la existencia de un biofilm macroscópicamente visible en el interior de las cajas de Teflón presente ya a las 72 h post-inoculación y de mayor tamaño a las 2 y 3 semanas posteriores a la inoculación. La presencia de este biofilm se ilustra en la Figura V.4.

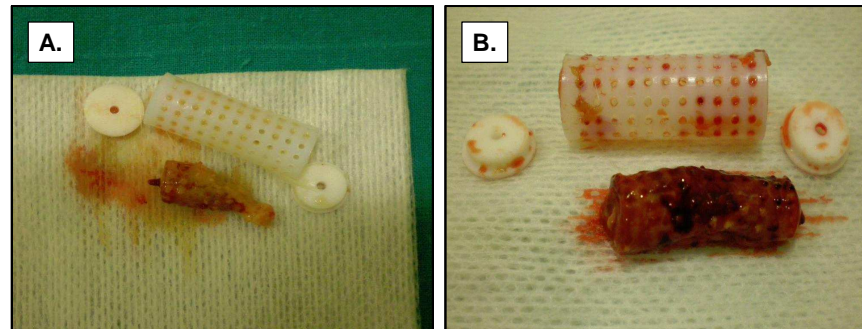


Figura V.4. Fotografías del biofilm obtenidas después de 72 horas (A) y 3 semanas (B) de evolución de la infección de cuerpo extraño.

iv/ Presencia de bacterias adherentes

Se realizaron recuentos bacterianos de las bacterias adheridas a las piezas de metacrilato del interior de las cajas de Teflón y comprobamos que a las 72 h post-inoculación eran ya de 5 log UFC/ml y que presentaban un discreto aumento a los 15 y 21 días post-inoculación.

v/ Presencia de bacterias intracelulares

Estandarizamos la metodología que nos permitió separar la fracción de bacterias presentes en el líquido de las cajas que se encontraban en posición extracelular de las que estaban en una localización intracelular. Los procesos realizados con las muestras incluyeron su centrifugación, filtración y exposición a gentamicina, un antibiótico que no penetra en las células eucariotas; todos estos procedimientos se encuentran explicados con detalle en la sección de Metodología del Artículo 2. Los resultados nos permitieron comprobar que tras 3 semanas de evolución espontánea de la infección de cuerpo extraño, la mayor parte del inóculo bacteriano se encontraba en posición

intracelular; los distintos recuentos bacterianos para los compartimentos extra e intracelular se muestran en la Figura V.5.

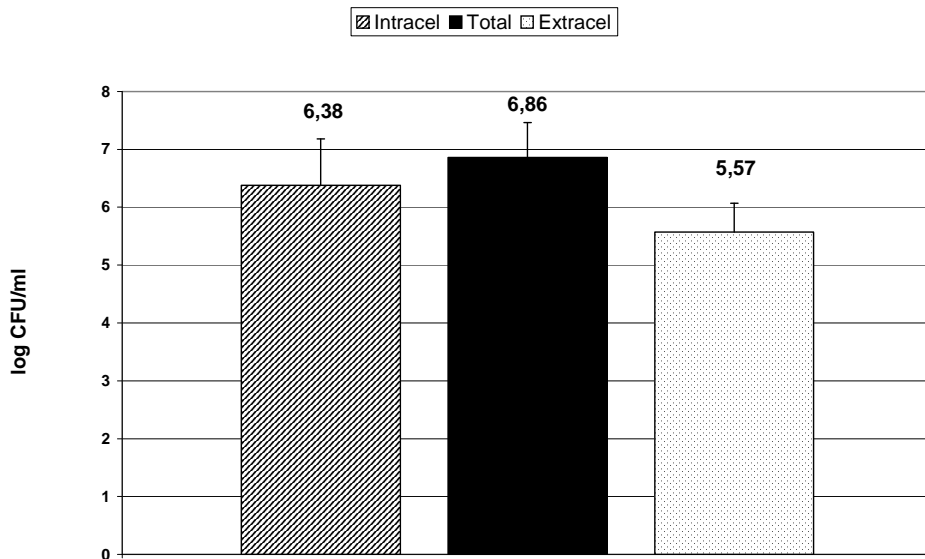


Figura V.5. Se muestran los recuentos bacterianos (media de log CFU/ml) en el líquido de las cajas después de 3 semanas de evolución de la infección de cuerpo extraño (Total); de ellos se cuantificaron los recuentos de bacterias en localización intracelular (Intracel) y extracelular (Extracel). Las barras de error representan la desviación estándar.

Para comprobar que el procedimiento utilizado conseguía una buena diferenciación de la población de bacterias intracelulares realizamos diversas fotografías con microscopía electrónica de estas muestras. En la Figura V.6 se observan imágenes de *S. aureus* intracelulares.

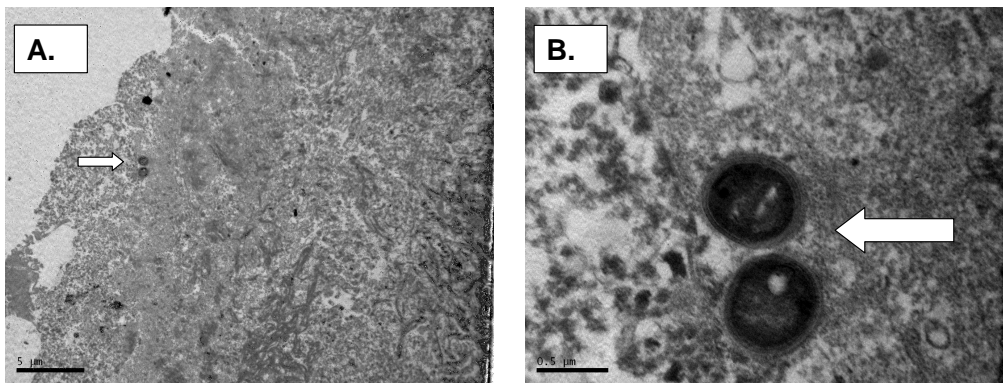


Figura V.6. Fotografías obtenidas por microscopía electrónica de una célula fagocítica infectada por *S. aureus* después de 3 semanas de evolución espontánea de la infección de cuerpo extraño. Se aprecia la presencia de *S. aureus* libre en el citoplasma (flecha blanca); aumento X4000 (A) y X40000 (B).

Estos estudios preliminares fueron el punto de partida del Artículo 2 encaminado a evaluar la eficacia de un antibiótico con reconocida eficacia intracelular (levofloxacino) frente a otro con menor actividad a este nivel (cloxacilina). Levofloxacino fue significativamente más activo que cloxacilina ($P < 0.05$) tanto frente a bacterias de localización intracelular como extracelular. Al analizar la eficacia final de levofloxacino frente a bacterias en una u otra localización observamos que la actividad fue mayor intracelularmente rozando la significación estadística ($P = 0.1$). Estos resultados se muestran representados en la Figura V.7.

El análisis poblacional de las bacterias recuperadas al final del tratamiento antibiótico con levofloxacino comparado con el de la cepa original SAMS 29213 mostró que la frecuencia de mutantes fue similar en ambas situaciones.

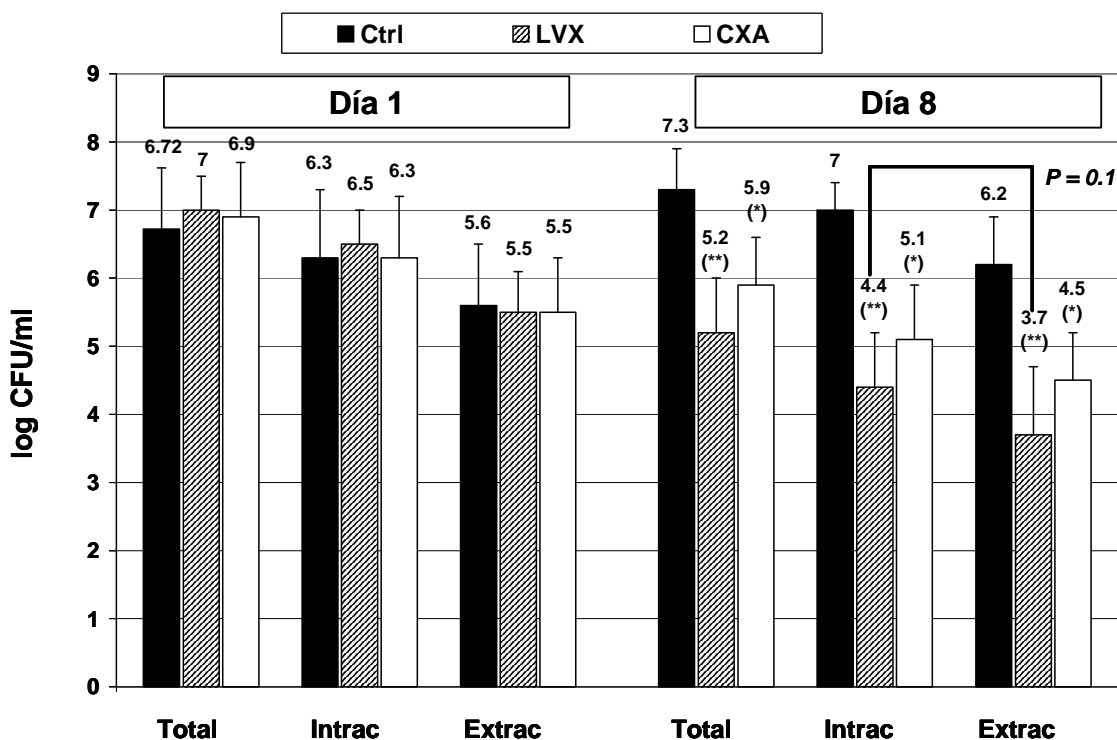


Figura V.7. Comparación entre grupos terapéuticos de los recuentos bacterianos del líquido de las cajas analizadas por separado para la población total, la intracelular y la extracelular. Abreviaciones: Ctrl (controles), LVX (levofloxacino), CXA (cloxacilina), Intrac (bacterias intracelulares), Extrac (bacterias extracelulares); * $p < 0.05$ vs. controles; ** $p < 0.05$ vs. controles y vs. cloxacilina.

1.c/ Estudios de farmacocinética-farmacodinámica.

Los estudios farmacocinéticos nos permitieron seleccionar las dosificaciones más adecuadas para cada antibiótico; se realizaron siempre en suero y líquido de las cajas de los animales. A modo de ejemplo se muestran las gráficas de concentración-tiempo obtenidas para cloxacilina y levofloxacino (Figura V.8).

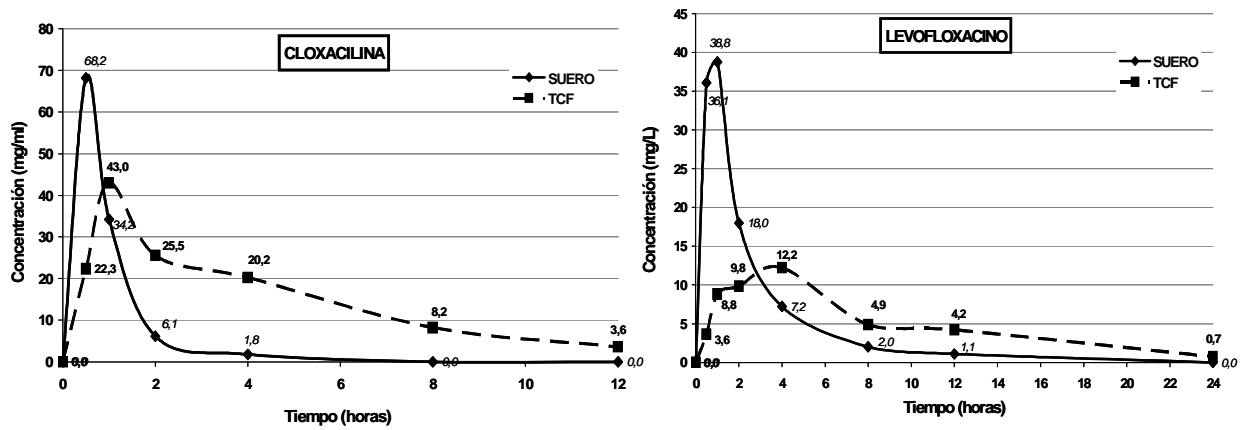


Figura V.8. Gráficas concentración-tiempo de cloxacilina y levofloxacin en suero y líquido de las cajas (TCF) después de la administración de una dosis única de cloxacilina 200 mg/kg y de levofloxacin 100 mg/kg. Se muestran los valores obtenidos en cada punto horario.

A partir de las gráficas de concentración-tiempo se determinaron los principales parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos en ratas que se compararon con los obtenidos en humanos con dosis convencionales (Tabla V.1). Para todos los antibióticos excepto cloxacilina se seleccionó la dosificación en ratas que aseguraba un AUC (en suero y líquido de las cajas del animal) similar al de humanos en sangre; en el caso particular de la dosis de cloxacilina en la rata se aseguró un $T > CMI$ 100% en el líquido de las cajas ya que es el parámetro farmacodinámico humano considerado óptimo para una buena actividad de cloxacilina.

Antibiótico (mg.kg/h)	RATAS							HUMANOS		
	TCF						Suero		Suero	
	C _{max} (mg/L)	^a Valle (mg/L)	AUC (µg.h/ml)	AUC/MIC	C _{max} /MIC	T _{>MIC} (%)	C _{max} (mg/L)	AUC (µg.h/ml)	C _{max} (mg/L)	AUC (µg.h/ml)
Cloxacilina (200/12)	43	3.88	^b ND	ND	ND	100	68.18	ND	60-80	ND
Levofloxacino (100 / 24)	12.2	1.1	117.36	234.72	24.4	100	38.7	106	12-15	90-120
Levofloxacino (50 / 24)	6.9	0.6	68.1	136.2	13.8	100	24	77	7	45-70
Linezolid (35 / 12)	17.5	2.6	245.25	61.31	4.37	63.5	38.47	302	12-15	180-220
Rifampicina (25 / 12)	6.6	3.8	304	20260	440	100	24	277.6	8	150-200
Vancomicina (50 / 12)	31.5	4.6	343.64	171.82	15.7	100	80.7	302	30-40	380-420

Tabla V.1. Principales parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos con las dosis en ratas y sus equivalentes en humanos para las dosis convencionales. En el caso de levofloxacino las dosis de 100 y 50 en ratas corresponden a las de 750-1000mg/d y 500 mg/d en humanos. ^a Las concentraciones Valle fueron determinadas el día 4 de tratamiento. ^b ND: no determinado.

ANEXO

Artículo 1. O. Murillo, A. Domenech, A. Garcia, F. Tubau, C. Cabellos, F. Gudiol, J. Ariza. "Efficacy of high doses of levofloxacin in experimental foreign-body infection by methicillin-susceptible *S. aureus*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2006; 50:4011-4017.

Artículo 2. O. Murillo, ME. Pachón, G. Euba, R. Verdaguer, M. Carreras, C. Cabellos, J. Cabo, F. Gudiol, J. Ariza. "Intracellular antimicrobial activity appearing as a relevant factor in the antibiotic efficacy against an experimental foreign-body infection by *S. aureus*." In review.

Efficacy of High Doses of Levofloxacin in Experimental Foreign-Body Infection by Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*[∇]

O. Murillo,^{1*} A. Doménech,¹ A. Garcia,² F. Tubau,² C. Cabellos,¹ F. Gudiol,¹ and J. Ariza¹

Laboratory of Experimental Infection, Infectious Diseases Service,¹ and Microbiology Department,² IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, Feixa Llarga s/n, 08907 Barcelona, Spain

Received 28 April 2006/Returned for modification 26 May 2006/Accepted 20 September 2006

Antimicrobial efficacy in orthopedic device infections is diminished because of bacterial biofilms which express tolerance to antibiotics. Recently, the use of high doses of levofloxacin with rifampin has been recommended for staphylococcal infections. In the present study, we evaluated the efficacy of levofloxacin at doses of 50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day (mimicking the usual and high human doses of 500 mg/day and 750 to 1,000 mg/day, respectively) and compared it to that of linezolid, cloxacillin, vancomycin, and rifampin in a rat tissue cage model of experimental foreign-body infection by *Staphylococcus aureus*. The antimicrobial efficacy in vitro (by MIC, minimum bactericidal concentration, and kill curves) for logarithmic- and stationary-phase bacteria was compared with the in vivo efficacy. In vitro bactericidal activity at clinically relevant concentrations was reached by all drugs except rifampin and linezolid in the log-phase studies but only by levofloxacin in the stationary-phase studies. The bacterial count decreases from in vivo tissue cage fluids (means) for levofloxacin at 50 and 100 mg/kg/day, rifampin, cloxacillin, vancomycin, linezolid, and controls, respectively, were: -1.24 , -2.26 , -2.1 , -1.56 , -1.47 , -1.15 , and 0.33 (all groups versus controls, $P < 0.05$). Levofloxacin at 100 mg/kg/day (area under the concentration-time curve/MIC ratio, 234) was the most active therapy ($P = 0.03$ versus linezolid). Overall, in vivo efficacy was better predicted by stationary-phase studies, in which it reached a high correlation coefficient even if the rifampin group was excluded ($r = 0.96$; $P < 0.05$). Our results, including in vitro studies with nongrowing bacteria, pharmacodynamic parameters, and antimicrobial efficacy in experimental infection, provide good evidence to support the use of levofloxacin at high doses (750 to 1,000 mg/day), as recently recommended for treating patients with orthopedic prosthesis infections.

Patients suffering from orthopedic device infections will have usually undergone surgical interventions and received antibiotic therapies over a long period of time, these being major clinical issues. It is very difficult to eradicate such infections using antibiotics because of the formation of biofilm, a protein matrix including bacteria with reduced metabolism and with tolerance to antimicrobials (2, 9, 11, 38).

These infections are frequently caused by *Staphylococcus aureus*, and rifampin has been shown to be the most effective antimicrobial agent in such cases, in in vitro and experimental studies (26, 48) and in clinical practice (14, 15, 46). Since this drug should not be given alone due to the development of early bacterial resistance, antibiotic combinations are required. The combination of rifampin and fluoroquinolones has been found to be particularly efficacious and is thus usually recommended (10, 14, 44).

In recent years, the experimental foreign-body infection model developed by Lucet et al. (26) has provided relevant data regarding the antimicrobial efficacy of several antibiotics against *S. aureus* (4, 10, 36, 45). This information has helped define the most appropriate therapeutic schedules in patients with orthopedic device infections.

Levofloxacin, a newer fluoroquinolone with high in vitro

staphylococcal activity, has shown good efficacy in an experimental model (42) and is being progressively introduced in clinical practice; however, its specific efficacy in orthopedic device infections has not been clearly established in clinical trials. Moreover, the use of high doses has recently been recommended based on its pharmacodynamic (PD) properties and on information obtained from in vitro models (19, 20, 47).

The present research used this foreign-body infection model to evaluate the efficacy of usual and high doses of levofloxacin compared to other antistaphylococcal antimicrobials, such as rifampin, cloxacillin, and vancomycin; linezolid, a promising new drug in the therapy of these infections, was also included. The aim of our study was to determine the in vivo efficacy of different doses of levofloxacin in an animal model of foreign-body infection and thus to provide helpful information to be used in studies to determine the most appropriate dose of this antibiotic in patients with orthopedic infections.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism used and determination of MICs and minimum bactericidal concentrations (MBCs). We used methicillin-susceptible *S. aureus* strain ATCC 29213, which is also susceptible to all antibiotics tested in our experiments.

The MIC and MBC were determined according to standard recommendations (31). We used a Mueller-Hinton broth (MHB) macrodilution method with a final inoculum of 10^5 to 10^6 CFU/ml under exponential growth conditions. Both MICs and MBCs were determined after 24 h of incubation at 37°C; the MIC was defined as the minimum concentration of antibiotic that was able to inhibit visible bacterial growth, while the MBC was the lowest concentration which killed 99.9% of the original inoculum.

* Corresponding author. Mailing address: Infectious Diseases Service, Hospital Universitari de Bellvitge, Feixa Llarga s/n, L'Hospitalet de Llobregat, 08907 Barcelona, Spain. Phone: 34.93.260.76.25. Fax: 34.93.260.76.37. E-mail: 32186omr@comb.es.

[∇] Published ahead of print on 2 October 2006.

We also determined MBCs during the stationary phase of growth. Bacteria, which were recovered from an overnight culture in Trypticase soy broth, were centrifuged and resuspended in a nutrient-restricted medium (phosphate-buffered saline [PBS], 1% glucose, and 4% MHB), thus ensuring that bacteria remained stable for up to 24 h under these conditions (48). A macrodilution method with a high inoculum of 10^8 CFU/ml was used. The MBCs were defined as described above.

In vitro time-kill curves. Time-kill curves to determine bactericidal activity during the exponential growth phase were derived following standard recommendations (30), with 10 ml of MHB, a final inoculum of 10^5 CFU/ml, and a prefixed concentration of antibiotic (multiples of the MIC, designated $0.5\times$, $1\times$, $2\times$, $4\times$, $8\times$, $16\times$, $128\times$, $256\times$, and $512\times$ MIC, according to the drug used). Quantitative bacterial counts were determined as log CFU/ml at 8 and 24 h of incubation at 37°C . To avoid carryover antimicrobial agent interference, the sample was placed on the plate in a single streak down the center and allowed to absorb into the agar until the plate surface appeared dry, and the inoculum was then spread over the plate.

We also carried out studies with bacteria in the stationary phase by using a final inoculum of 10^8 CFU/ml and replacing MHB with a nutrient-restricted medium as described above. The prefixed antibiotic concentrations were equivalent to peak, trough, and intermediate levels in tissue cage fluids (TCF); the concentrations ($\mu\text{g/ml}$) tested were 32, 16, and 2 for cloxacillin; 8, 4, and 1 for levofloxacin; 16, 4, and 2 for linezolid; 8 and 4 for rifampin, and 32, 16, and 4 for vancomycin.

The reduction in log CFU/ml counts at the end of experiments with respect to the initial inoculum (log CFU/ml) was determined for each antibiotic concentration, and efficacy was expressed as the percentage of eradicated bacteria (PEB) in both the exponential and stationary studies.

Preparation of inoculum for in vivo use. Bacteria from overnight cultures on 5% blood agar plates were grown for 4 to 6 h in Trypticase soy broth. They were then centrifuged and resuspended in sterile saline solution adjusted to an optical density of a 0.5 McFarland standard and finally diluted to a concentration of 0.2×10^6 to 2×10^6 CFU/ml.

Antimicrobial agents. For all in vitro experiments, and for the in vivo experiment with levofloxacin, the purified powder of each antibiotic was resuspended following the respective laboratory's recommendations. For the remaining in vivo studies, we used commercial products, with the necessary dilutions being performed to achieve a final volume that could be administered to animals.

All antibiotics were supplied by their respective laboratories, as follows: levofloxacin was supplied by Aventis Pharma, Frankfurt, Germany; rifampin by Aventis Pharma, Madrid, Spain; linezolid by Pfizer, Madrid, Spain; and cloxacillin and vancomycin by Normon, Madrid, Spain.

Animal studies. (i) Animal model. The study was previously approved by the Ethical Committee for Animal Experiments at the University of Barcelona.

Male Wistar rats weighing 220 to 250 g at the beginning of the experiments were used; they were given food and water ad libitum throughout the study. For the surgical procedure, the rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg; Parke-Davis, Madrid, Spain) plus xilacine (20 mg/kg; Bayer, Barcelona, Spain); they also received analgesia with buprenorphine (0.01 mg/kg; Schering Plough, Madrid, Spain). To obtain samples during the experiment, rats were anesthetized with isoflurane (Abbott, Madrid, Spain). Animals were sacrificed by cardiac puncture with thiopental (Braun, Barcelona, Spain).

We used a model previously described by Lucet et al. (26), the only modification being the number of tissue cages for each animal. In brief, two multiperforated polytetrafluoroethylene (Teflon) tissue cages (internal and external diameter of 10 and 12 mm, respectively; length, 32 mm) containing two polymethylmethacrylate coverslips (7 by 7 by 1 mm) each were subcutaneously implanted in rats. Three weeks after surgery, TCF were percutaneously obtained and checked for sterility; when bacterial contamination was excluded, TCF were then inoculated with 0.1 ml of saline solution containing an inoculum of *S. aureus*. Three weeks after inoculation (designated day 1), 0.1 ml of TCF was processed (see below) to determine bacterial counts, which were expressed as log CFU/ml; those with fewer than 10^5 CFU/ml were excluded. Animals were sacrificed only if results for both tissue cages were not valid. Rats included in the experiment were then assigned randomly to groups to be intraperitoneally treated for seven days with antibiotics (twice daily for all drugs except levofloxacin, which was administered once daily) or to be left untreated. Twelve to 24 h after the end of therapy (designated day 8), TCF were cultured to determine the bacterial counts. The difference in the number of log CFU/ml between day 1 and day 8 ($\Delta\log$ CFU/ml) was defined as the criterion of antibiotic efficacy. The in vivo PEB from these counts with respect to initial counts was also determined as described above for in vitro studies.

Prior studies to evaluate the spontaneous course of tissue cage fluid infection were performed by analyzing TCF on days 7, 14, 16, 21, 28, and 35 after inoculation. After TCF was infected with 0.2×10^6 to 2×10^6 CFU/ml of initial inoculum, lower bacterial counts (means of log CFU/ml \pm standard deviations) during weeks 1 and 2, ranging from 4.86 ± 0.46 on day 7 to 5.67 ± 0.35 on day 14, were observed. Bacterial counts close to that of the initial inoculum were recovered on day 16 (6.39 ± 0.8) and after a chronic and stable infection was established, as previously reported (26), ranging from 7.07 ± 0.5 on day 20 to 7.2 ± 0.9 on day 35. Spontaneous shedding of approximately 15 to 20% of the tissue cages was noted.

(ii) Processing of TCF and coverslips. The processing schedules were performed according to previous reports, in which they were described as being harmless to bacteria (9, 26). TCF were obtained by percutaneous puncture under aseptic conditions and were sonicated (150 W for 1 min; Afora, Madrid, Spain) to disrupt bacterial clumps. A sample of 100 μl of the sonicated fluids and their 10-fold dilutions was plated on a Trypticase soy agar plate with 5% sheep blood for 48 h at 37°C ; to avoid a carryover antimicrobial effect, we proceeded as described above for kill curves. Bacterial counts were recorded as log CFU per ml. The lower detection limit was 100 CFU/ml.

When animals were sacrificed, coverslips from tissue cages were removed under aseptic conditions and rinsed three times in 1 ml of PBS; they were then incubated in 1 ml of PBS with trypsin (6 U/ml; Sigma, Madrid, Spain) for 20 min at 37°C . Finally, the remaining PBS was sonicated to recover adherent bacteria, with the final fluid being used to screen resistant bacteria (see below).

Pharmacokinetic studies. Prior to therapeutic experiments, pharmacokinetic (PK) and PD profiles of each drug in healthy animals were studied. We administered a single weight-adjusted dose of antibiotic to a group of 10 rats, and samples of blood and TCF were obtained at different time points (after 30 min and 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, and 24 h, according to the antibiotic). In all cases, a minimum of four samples for each time point at a minimum of six time points for each drug were studied. Moreover, peak and trough concentrations were determined on day 4 of therapy in TCF to test the equilibrium concentration achieved. Blood and TCF samples were obtained by cardiac and percutaneous puncture, respectively, through the tissue cage; both samples were then centrifuged, and the remaining serum and fluid samples were conserved at -70°C until analysis.

The PK-PD parameters studied for both serum and TCF were as follows: the peak concentration (C_{max}), the elimination half-life ($t_{1/2}$), the elimination rate constant, the area under the concentration-time curve (AUC [$\mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$]) over 24 h, the time the drug concentration remained above the MIC ($T_{>\text{MIC}}$), the AUC/MIC ratio, and the $C_{\text{max}}/\text{MIC}$ ratio.

Based on previous experimental studies (13, 33, 43, 40), the definitive antibiotic doses were those achieving PD parameters in TCF that were similar to human ones in serum with conventional doses. For all drugs except cloxacillin, we adjusted AUC values to obtain similar AUC/MIC ratios in animals and in humans (7, 8, 24, 25, 32, 34). Free-drug concentrations were used for all drugs except vancomycin, for which the total drug and its protein binding were measured.

Final doses of antibiotics used were as follows: cloxacillin, 200 mg/kg/12 h; linezolid, 35 mg/kg/12 h; rifampin, 25 mg/kg/12 h; vancomycin, 50 mg/kg/12 h; and levofloxacin, 50 mg/kg/24 h (levofloxacin 50) and 100 mg/kg/24 h (levofloxacin 100).

Antibiotic assays. A bioassay method (5) was used to determine drug concentrations of all antibiotics except vancomycin. The following microorganisms were used in assays: *S. aureus* ATCC 29213 for cloxacillin, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 27626 for rifampin, *Bacillus subtilis* ATCC 12432 for linezolid, and *Escherichia coli* ATCC 35218 for levofloxacin. Studies were performed according to the previous literature.

The vancomycin concentrations were determined by fluorescent polarization immunoassays using a TDX analyzer (Abbott, Madrid, Spain). To measure the binding of vancomycin in TCF, ultrafiltration was performed using a centrifugal filter device (Centrifree; Millipore Corp., Bedford, Mass.) (42). In vivo TCF samples containing vancomycin were analyzed by fluorescent polarization immunoassays; samples were first ultrafiltered or were used without filtration to determine the protein binding. PBS-buffered samples containing vancomycin was used as controls.

Resistance to antimicrobial agents. For the linezolid and rifampin therapeutic groups, the development of resistance at the end of therapy was screened. In all cases, 100 μl of direct TCF and processed fluid from coverslips were cultured in plates containing 4 mg/liter linezolid or 4 mg/liter rifampin. Results were expressed qualitatively as positive (with any macroscopic growth) or negative (with no macroscopic growth).

Statistical studies. All bacterial counts are presented as log CFU/ml (means \pm standard deviations). Data were found to be normally distributed when the

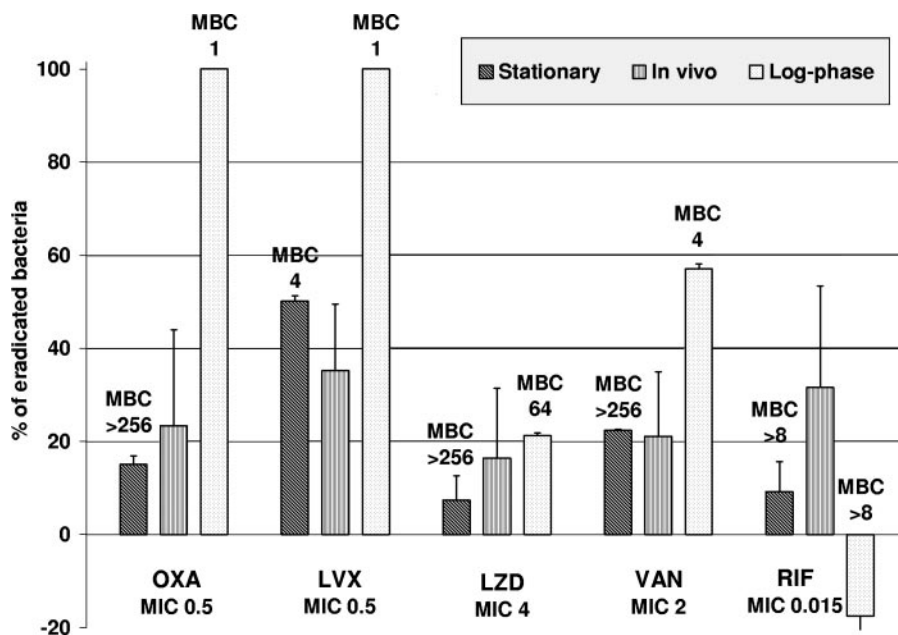


FIG. 1. Relationships between in vivo, in vitro log-phase, and in vitro stationary-phase PEBs. Drug concentrations ($\mu\text{g/ml}$) for the log phase and stationary phase, respectively, are as follows: cloxacillin (OXA), 4 and 32; levofloxacin (LVX), 4 and 4; linezolid (LZD), 16 and 16; vancomycin (VAN), 16 and 32; and rifampin (RIF), 8 and 8. MICs ($\mu\text{g/ml}$) for each antibiotic in the log phase are noted. MBCs ($\mu\text{g/ml}$) for the log phase and stationary phase are shown on top of the respective column for each antibiotic. Errors bars indicate standard deviations.

Kolmogorov-Smirnov test was applied. Analysis of variance and Scheffe's correction were used to compare differences between groups in bacterial counts. Studies of correlation were performed using Pearson's coefficient from mean PEBs. For all tests, differences were considered statistically significant when P values were <0.05 .

RESULTS

In vitro studies. The MICs and MBCs for the exponential and stationary phases for each antibiotic are shown in Fig. 1.

In log-phase studies, cloxacillin, vancomycin, and levofloxacin reached a MBC/MIC ratio of 2 as the bactericidal antibiotic profile, whereas linezolid and rifampin had a ratio of 16 and >512 , respectively, in terms of bacteriostatic activity. In comparison with log-phase studies of MBCs, stationary-phase studies revealed increases in the MBCs of all antibiotics; MBCs were found at clinically relevant concentrations only for levofloxacin. Rifampin showed high MBCs in both phases.

Time-kill curves for the exponential phase showed bactericidal activity by levofloxacin, cloxacillin, and vancomycin at concentrations of $2\times$ MIC; observations at higher concentrations showed that levofloxacin and cloxacillin were able to kill all original inoculum at $2\times$ MIC and $8\times$ MIC, respectively. At 8 h, levofloxacin reached a potent killing rate, one that was even better than that of cloxacillin for all equivalent concentrations tested.

Stationary-phase kill curve studies showed that only levofloxacin reached bactericidal activity, although higher concentrations ($8\times$ MIC) than those observed during the exponential phase were required. Rifampin never achieved a bactericidal effect in either phase, even when concentrations as high as $512\times$ MIC were tested; some log-phase studies resulted in final regrowth due to the development of resistance, whereas this

phenomenon was not observed for the stationary phase. Linezolid showed bactericidal activity at high doses ($16\times$ MIC) for exponential-phase studies but only bacteriostatic activity in stationary-phase kill curves. Time-kill curves for the clinically relevant concentrations for which the highest efficacy was achieved during the two phases are shown in Fig. 2; we noted that the concentrations required in the stationary-phase studies were close to the peak level for all antibiotics, whereas lower concentrations for some antibiotics were required in the log phase.

Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies. The main parameters in serum and TCF for each antibiotic are shown in Table 1. Two doses of levofloxacin were selected in order to mimic human pharmacodynamic profiles of 500 mg/day (50 mg/kg/day in rats) and 750 to 1,000 mg/day (100 mg/kg/day in rats). The C_{max} in TCF for cloxacillin was 43 $\mu\text{g/ml}$. The AUC, $C_{\text{max}}/\text{MIC}$ ratio, and AUC/MIC ratio were not determined due to the time-dependent killing of beta-lactams; thus, pharmacodynamic parameters were optimized, allowing a $T_{>\text{MIC}}$ of 100% in TCF. For the remaining antibiotics, the AUC values were consistent with those obtained for humans with conventional doses, and the serum and TCF results were similar for each antibiotic. All antibiotics except linezolid achieved a $T_{>\text{MIC}}$ of 100%. The trough concentrations were calculated on day 4 of therapy for TCF only. Our results didn't show any remarkable differences between the trough concentrations determined on day 4 of therapy and those determined by pharmacokinetic studies with healthy animals; these concentrations (in $\mu\text{g/ml}$) were, respectively, 3.88 and 3.59 for cloxacillin (the accumulation ratio [trough concentration on day 4/trough concentration on day 1] was 1.08), 1.1 and 0.74 for levofloxacin 100 (accumulation ratio, 1.48), 0.6 and 0.4 for levofloxacin 50 (ac-

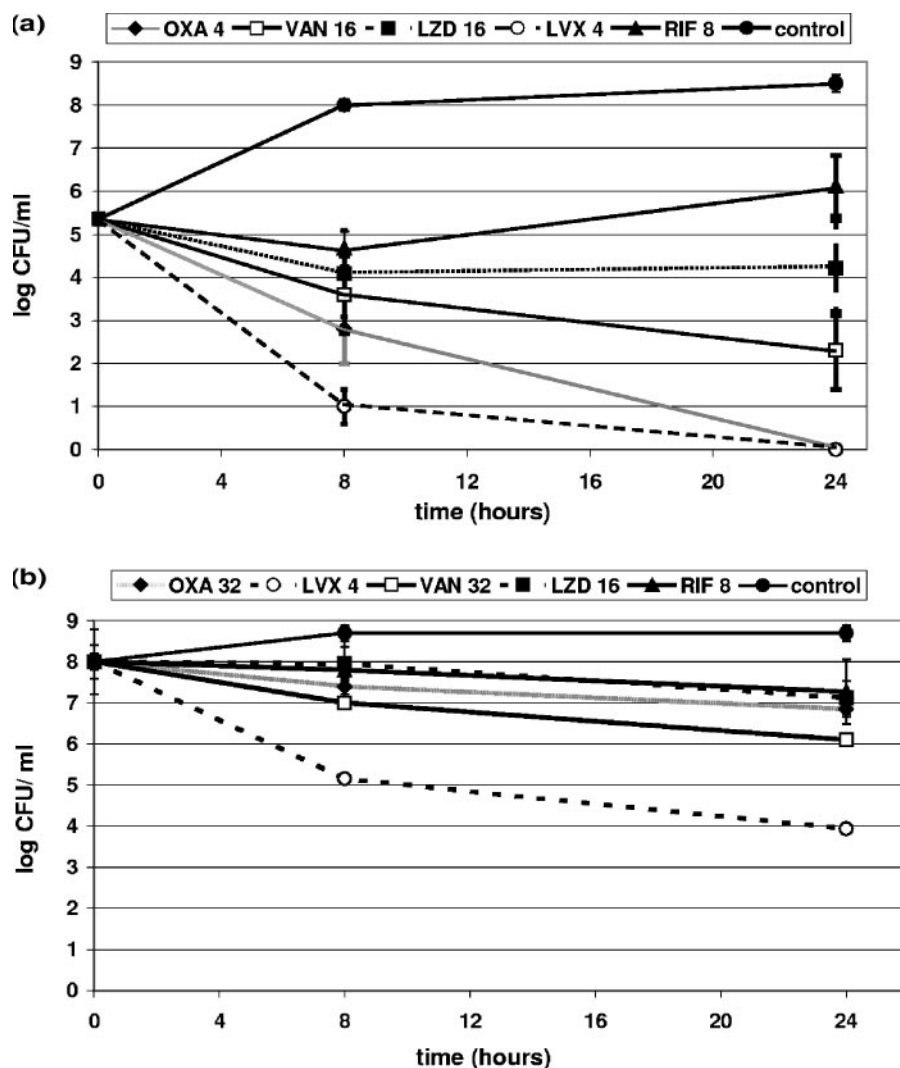


FIG. 2. Time-kill curves for the log phase (a) and stationary phase (b) with clinically representative concentrations ($\mu\text{g/ml}$). Errors bars indicate standard deviations. Abbreviations: OXA, cloxacillin; VAN, vancomycin; LZD, linezolid; LVX, levofloxacin; RIF, rifampin.

cumulation ratio, 1.5), 2.6 and 2.4 for linezolid (accumulation ratio, 1.08), 3.8 and 3.4 for rifampin (accumulation ratio, 1.11), and 4.6 and 4.2 for vancomycin (accumulation ratio, 1.09).

Animal studies. A total of 80 rats were used in the experiments and, after tissue cages with inadequate bacterial counts were excluded, the remaining animals were randomized to be treated. The final number of tissue cages for each therapeutic group was as follows: cloxacillin, 19; levofloxacin 50, 20; levofloxacin 100, 19; linezolid, 18; rifampin, 17; vancomycin, 19; and controls, 18.

Quantitative bacterial counts for different groups on day 1 (means \pm standard deviations) were 6.44 ± 0.80 for the cloxacillin group, 6.42 ± 0.89 for levofloxacin 100, 6.40 ± 0.80 for levofloxacin 50, 6.82 ± 0.86 for linezolid, 6.91 ± 0.78 for rifampin, 7.03 ± 0.86 for vancomycin, and 6.86 ± 0.88 for the controls; there were no statistical differences between groups on day 1 ($P > 0.05$).

A comparison of the final decreases in log CFU/ml between groups is shown in Fig. 3. All therapeutic groups were better

than the controls ($P < 0.05$); levofloxacin 100 was the most effective therapy, but it was significantly better than only linezolid ($P = 0.03$), which showed the least efficacy. Rifampin was the second most active therapy, although resistant strains were detected in 10 of the 17 samples. The screening of development of resistance was performed with the fluid from coverslips and from TCF; resistant strains were detected in fluid from all 10 coverslip samples and in 9 of 10 TCF samples. No resistance developed in the linezolid group at the end of therapy.

The correlations between in vivo and in vitro PEBs for the exponential and stationary studies (at equivalent clinical peak concentrations) were r values of 0.32 and 0.63, respectively. The major discrepancy was due to the rifampin group, in which there was a lack of correlation between in vivo and in vitro efficacy for the two phases. Finally, when the rifampin group was excluded, the correlations (r values) were 0.7 for the exponential phase and 0.96 ($P < 0.05$) for the stationary phase.

TABLE 1. Main pharmacokinetic parameters

Antibiotic (mg · kg/h)	Value for:									
	Rat						Human serum ^d			
	TCF			Serum			TCF		Serum	
	C _{max} (mg/liter)	Trough concn (mg/liter) ^a	AUC (µg · h/ml)	AUC/MIC	C _{max} /MIC	T _{>MIC} (%)	C _{max} (mg/liter)	AUC (µg · h/ml)	C _{max} (mg/liter)	AUC (µg · h/ml)
Cloxacillin (200/12)	43	3.88	ND ^b	ND	ND	100	68.18	ND	60–80	ND ^c
Levofloxacin (100/24)	12.2	1.1	117.36	234.72	24.4	100	38.7	106	12–15	90–120
Levofloxacin (50/24)	6.9	0.6	68.1	136.2	13.8	100	24	77	7	45–70
Linezolid (35/12)	17.5	2.6	245.25	61.31	4.37	63.5	38.47	302	12–15	180–220
Rifampin (25/12)	6.6	3.8	304	20,260	440	100	24	277.6	8	150–200
Vancomycin (50/12) ^c	31.5	4.6	343.64	171.82	15.7	100	80.7	302	30–40	380–420

^a Trough concentrations were determined on day 4 of therapy.
^b ND, not determined.
^c Vancomycin concentrations are expressed as total drug concentrations. A protein binding of 26% was calculated for TCF, whereas that of 30% was used for human serum.
^d The antibiotic doses in humans for which these pharmacokinetic parameters were achieved were as follows: cloxacillin, 2 g/4 h (25); levofloxacin, 750 to 1,000 mg/day (8) (equivalent to 100 mg/kg/day for rats); levofloxacin, 500 mg/day (32) (equivalent to 50 mg/kg/day for rats); linezolid, 600 mg/12 h (1); rifampin, 600 to 900 mg/day (25); and vancomycin, 1 g/12 h (24).
^e The human pharmacokinetic parameter considered optimal for cloxacillin activity was a T_{>MIC} of 100%.

DISCUSSION

Antimicrobial efficacy in orthopedic device infections is modified as a result of bacterial biofilm, including slow- and nongrowing microorganisms that are tolerant to antibiotics (9, 11, 23). Thus, bactericidal activity against these adherent bacteria has been considered the best parameter of antibiotic efficacy (48).

In this study, we evaluated in vitro antimicrobial activity by determining MICs and MBCs and killing curves for logarithmic and stationary planktonic bacteria, with these results then being compared with those obtained in vivo in a foreign-body infection model in rats.

Planktonic bacteria in the stationary phase show similarities to adherent bacteria in biofilms, as both express tolerance to antibiotics (17, 22, 45); thus, in vitro studies of such bacteria could provide useful information about the nature of these infections. Although the most appropriate method of obtaining

stationary-phase bacteria has not been definitively established (3, 17, 45), the conditions used in this study (48) seem to be suitable, provided that the bacteria remain stable under these conditions for up to 24 h.

Results of in vitro experiments on antimicrobial activity showed important differences when conducted with bacteria in the exponential versus the stationary phase. Classical anti-staphylococcal agents, such as cloxacillin and vancomycin, which act against cell-wall synthesis, were especially active against growing bacteria and showed bactericidal activity in time-kill curves for the exponential phase; this activity was not observed for the stationary phase. Rifampin never achieved a bactericidal effect in either phase. While rifampin has usually been considered an anti-staphylococcal bactericidal agent (28, 35, 41), some authors have reported results consistent with our own (3, 9, 17). In contrast, levofloxacin reached a potent killing rate in the log phase and it also showed bactericidal activity in the stationary phase, although higher concentrations than those for the exponential phase were required.

The animal model developed in the present study was based on that previously described by Lucet et al. (26), which was shown to be a reliable method that reasonably mimicked a chronic foreign-body infection. Our model introduced minor modifications, such as the use of two subcutaneous, multiperforated polytetrafluoroethylene (Teflon) tissue cages per animal, compared to the four implanted by Lucet et al. In agreement with their report, our evaluation of the spontaneous course of infection showed that a chronic and stable infection was established. The reductions in bacterial counts at the end of different antibiotic therapies in our experiments were slightly greater than those reported by Lucet using vancomycin and rifampin against methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA); we also reported a slightly greater reduction than that reported by Schaad et al. (36) using oxacillin against methicillin-susceptible *S. aureus*. The above results suggest that our model was well standardized and reproducible and suitable for use in experimental studies. An additional advantage of this animal model is its ability to determine local drug concentrations;

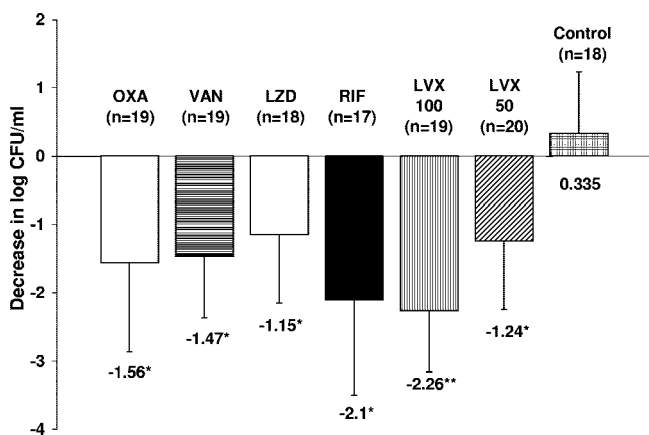


FIG. 3. Comparison of decreases in log CFU/ml (means) between groups at the end of therapy. Errors bars indicate standard deviations. Abbreviations: OXA, cloxacillin; VAN, vancomycin; LZD, linezolid; LVX, levofloxacin; RIF, rifampin. *, P < 0.05 versus the control; **, P = 0.03 versus LZD and P < 0.05 versus the control.

thus, we selected antibiotic doses whose pharmacodynamic parameters in TCF were close to those described for human serum with conventional doses (13, 43). While free-drug levels were determined for all drugs except vancomycin to establish comparisons, for this particular case, we measured the total drug concentration (and its protein binding of 26%) and compared it with the total drug concentration in human serum (with a similar protein binding of 30%).

In this animal model, all therapeutic groups achieved better results than controls ($P < 0.05$). Levofloxacin 100 was qualitatively the most effective therapy, but it was significantly better than only linezolid; rifampin was the second most active antibiotic, but its efficacy was limited by the observed early development of resistance in about 60% of cases, a well-described issue for this drug when administered alone (18).

The differences observed in experiments with levofloxacin 50 and levofloxacin 100, particularly the high efficacy of levofloxacin 100, should be noted. It is well established that the efficacy of fluoroquinolones is concentration dependent and that a peak/MIC ratio of ≥ 10 and an AUC/MIC ratio of >125 are required to ensure clinical efficacy and to avoid the possible development of resistant strains; moreover, an AUC/MIC ratio of close to 250 is recommended to achieve high efficacy in fluoroquinolones (12, 16, 37). However, these pharmacodynamic parameters were defined using ciprofloxacin against gram-negative bacilli (21), and recent studies have questioned their application when newer fluoroquinolones are used against different bacteria (19).

In the case of levofloxacin, the great majority of PK-PD human studies have been performed with a dose of 500 mg/day (19, 32, 40); our experimental group for levofloxacin 50 showed TCF levels consistent with this human dose. However, high doses of levofloxacin (750 to 1,000 mg/day) have been approved for treatment of nosocomial pneumonia and complicated skin structure infections and have recently been recommended for orthopedic prosthetic infections (47), given the inherent difficulties in curing them. There are few correlative PK-PD data available in support of this dose (8, 16); in this setting, the AUC of 110 reached by our levofloxacin 100 experimental group would be equivalent to the human AUC. The pharmacodynamic parameters we obtained using this high dose were very good: the peak/MIC ratio was 24, and the AUC/MIC ratio was 234. These results are consistent with the high in vivo efficacy observed previously. Levofloxacin at similar doses (100 mg/kg/day) was previously tested by Vaudaux et al. (42) with experimental foreign-body infection. Our AUC values were higher than those reported in that study, probably due to the fact that we detected higher peak concentrations in PK studies four hours after dose administration, a time point not evaluated by these authors.

When fluoroquinolones are used in monotherapy against *S. aureus* infection, the risk of resistant strain development should be considered if the C_{\max} /MIC ratio is not >8 to 10 (12, 39). We did not screen for the presence of resistant bacteria in our study, as they were not observed in the study by Vaudaux et al. with MRSA after 7 days of therapy; we thus considered that the risk of this phenomenon was minimal, given the good pharmacodynamic conditions of our model. However, most MRSA strains are currently resistant to fluoroquinolones, limiting their clinical use.

Linezolid is a new antibiotic of the oxazolidinone family with clear indications for gram-positive infections, especially against multidrug-resistant strains (6). In our animal studies, it showed low efficacy, despite the facts that the pharmacodynamic parameters obtained were in the range considered to be predictive of good efficacy (1) and were consistent with the same ratios obtained in humans for a 600 mg/12 h dose (27). Linezolid is considered a safe therapy in preventing the emergence of resistant *S. aureus*, although mutational mechanisms of resistance have been described (29). In our study, resistant strains were not detected at the end of the 7-day therapy. To the best of our knowledge, this is the first study to test the drug in experimental foreign-body infection, and our results suggest that other therapies may be more effective against methicillin-susceptible *S. aureus* in such infections. However, as few alternative therapies exist, its use in combination with rifampin or against MRSA should be studied.

Overall, when the results with the animal model were compared to those from in vitro studies, we observed that in vivo efficacy, expressed as PEB, was predicted mainly by the activity shown in the stationary phase of in vitro studies. Major discrepancies in predicted efficacy were due to rifampin results, due to the good in vivo activity versus the poor in vitro killing rates in both phases. Thus, although more studies are needed, it would seem that using bacteria in the stationary phase of growth may yield reliable information about antimicrobial efficacy in orthopedic device infections.

In conclusion, our results, including in vitro studies with nongrowing bacteria, pharmacodynamic parameters, and antimicrobial efficacy in experimental foreign-body infections, provide good evidence of the antistaphylococcal efficacy of high doses of levofloxacin in this setting. This information could be useful to support the recent recommendation of using levofloxacin at high doses (750 to 1,000 mg/day) in patients with orthopedic prosthetic infections. Further studies are required to determine whether these results are replicated when fluoroquinolones other than levofloxacin are used in monotherapy and when fluoroquinolones and rifampin are used in combination.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank C. Masuet, Hospital Universitari de Bellvitge, for her assistance with the statistical analysis.

This work was supported by a research grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias FIS 04/005 from Ministerio de Sanidad, Spain. O.M. was supported by a grant from the Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI), and A.D. was supported by a grant from the Universidad de Barcelona. The study was performed without any financial support from pharmaceutical laboratories.

REFERENCES

- Andes, D., M. Van Ogtrop, J. Peng, and W. Craig. 2002. In vivo pharmacodynamics of a new oxazolidinone (linezolid). *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3484–3489.
- Anwar, H., M. K. Dasgupta, and J. W. Costerton. 1990. Testing the susceptibility of bacteria in biofilms to antibacterial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:2043–2046.
- Bahl, D., D. A. Miller, I. Leviton, P. Gialanella, M. Wolin, W. Liu, R. Perkins, and M. H. Miller. 1997. In vitro activities of ciprofloxacin and rifampin alone and in combination against growing and nongrowing strains of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1293–1297.
- Cagni, A., C. Chuard, P. Vaudaux, J. Schrenzel, and D. P. Lew. 1995. Comparison of sparfloxacin, temafloxacin, and ciprofloxacin for prophylaxis and treatment of experimental foreign-body infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1655–1660.

5. Chapin-Robertson, K., and S. C. Edberg. 1991. Measurements of antibiotics in human body fluids: techniques and significance, p. 295–366. In V. Lorian (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*. Williams and Wilkins, New York, N.Y.
6. Chien, J. W., M. L. Kucia, and R. A. Salata. 2000. Use of linezolid, an oxazolidinone, in the treatment of multidrug-resistant gram-positive bacterial infections. *Clin. Infect. Dis.* **30**:146–151.
7. Chien, S., M. Rogge, L. Gisclon, C. Curtin, F. Wong, J. Natarajan, R. Williams, C. Fowler, W. Cheng, and A. Chow. 1997. Pharmacokinetic profile of levofloxacin following once-daily 500-milligram oral or intravenous doses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2256–2260.
8. Chow, A. T., C. Fowler, R. Williams, N. Morgan, S. Kaminski, and J. Natarajan. 2001. Safety and pharmacokinetics of multiple 750-milligram doses of intravenous levofloxacin in healthy volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2122–2125.
9. Chuard, C., J. C. Lucet, P. Rohner, M. Herrmann, R. Auckenthaler, F. A. Waldvogel, and D. P. Lew. 1991. Resistance of *Staphylococcus aureus* recovered from infected foreign body in vivo to killing by antimicrobials. *J. Infect. Dis.* **163**:1369–1373.
10. Chuard, C., M. Herrmann, P. Vaudaux, F. A. Waldvogel, and D. P. Lew. 1991. Successful therapy of experimental chronic foreign-body infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antimicrobial combinations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:2611–2616.
11. Costerton, J. W., P. Stewart, and E. P. Greenberg. 1999. Bacterial biofilm: a common cause of persistent infections. *Science* **284**:1318–1322.
12. Craig, W. 2001. Does the dose matter? *Clin. Infect. Dis.* **33**(Suppl. 3):233–237.
13. Craig, W. A. 1998. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin. Infect. Dis.* **26**:1–12.
14. Drancourt, M., A. Stein, J. N. Argenson, A. Zannier, G. Curvale, and D. Raoult. 1993. Oral rifampin plus ofloxacin for treatment of *Staphylococcus*-infected orthopedic implants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:1214–1218.
15. Drancourt, M., A. Stein, J. N. Argenson, R. Roiron, P. Groulier, and D. Raoult. 1997. Oral treatment of *Staphylococcus* spp. infected orthopedic implants with fusidic acid or ofloxacin in combination with rifampin. *J. Antimicrob. Chemother.* **39**:235–240.
16. Drusano, G. L., S. Preston, C. Fowler, M. Corrado, B. Weisinger, and J. Kahn. 2004. Relationship between fluoroquinolone area under curve: minimum inhibitory concentration ratio and the probability of eradication of the infecting pathogen, in patients with nosocomial pneumonia. *J. Infect. Dis.* **189**:1590–1597.
17. Eng, R. H., F. Padberg, S. Smith, E. Tan, and C. E. Cherubin. 1991. Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:1824–1828.
18. Eng, R. H., S. M. Smith, M. Tillem, and C. Cherubin. 1985. Rifampin resistance. Development during the therapy of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Arch. Intern. Med.* **145**:146–148.
19. Firsov, A., I. Lubenko, S. Vostrov, Y. Portnoy, and S. Zinner. 2005. Anti-staphylococcal effect related to the area under the curve/MIC ratio in an in vitro dynamic model: predicted breakpoints versus clinically achievable values for seven fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:2642–2647.
20. Firsov, A., S. Zinner, S. Vostrov, Y. Portnoy, and I. Lubenko. 2002. AUC/MIC relationships to different endpoints of the antimicrobial effect: multiple-dose *in vitro* simulations with moxifloxacin and levofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**:533–539.
21. Forrest, A., D. Nix, C. Ballow, T. Goss, M. Birmingham, and J. Schentag. 1993. Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:1073–1081.
22. Fux, C. A., J. W. Costerton, P. Stewart, and P. Stoodley. 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* **13**:34–40.
23. Gilbert, P., P. J. Collier, and M. R. W. Brown. 1990. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:1865–1868.
24. James, J. K., S. Palmer, D. P. Levine, and M. J. Rybak. 1996. Comparison of conventional dosing versus continuous-infusion vancomycin therapy for patients with suspected or documented gram-positive infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:696–700.
25. Kucers, A., S. Crowe, M. L. Grayson, and J. Hoy. 1997. Rifampicin (rifampin), p. 676–708. In A. Kucers, S. Crowe, M. L. Grayson, and J. Hoy (ed.), *The use of antibiotics. A clinical review of antibacterial, antifungal and antiviral drugs*, 5th ed. Butterworth, Heinemann, Oxford, United Kingdom.
26. Lucet, J. C., M. Herrmann, P. Rohner, R. Auckenthaler, F. A. Waldvogel, and D. P. Lew. 1990. Treatment of experimental foreign body infection caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:2312–2317.
27. MacGowan, A. P. 2003. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of linezolid in healthy volunteers and patients with gram-positive infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**(Suppl. 2):17–25.
28. Maduri Traczewski, M., D. Goldmann, and P. Murphy. 1983. In vitro activity of rifampin in combination with oxacillin against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **23**:571–576.
29. Meka, V. G., S. Pillai, G. Sakoulas, C. Wennersten, L. Venkataraman, P. DeGirolami, G. Eliopoulos, R. Moellering, and H. S. Gold. 2004. Linezolid resistance in sequential *Staphylococcus aureus* isolates associated with T2500A mutation in the 23S rRNA gene and loss of a single copy of rRNA. *J. Infect. Dis.* **190**:311–317.
30. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1999. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. M26-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
31. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, 5th ed., M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
32. Preston, S. L., G. L. Drusano, A. L. Berman, C. L. Fowler, A. T. Chow, B. Dornseif, V. Reichl, J. Natarajan, and M. Corrado. 1998. Pharmacodynamics of levofloxacin: a new paradigm for early clinical trials. *JAMA* **279**:125–129.
33. Ryan, M., B. Hodges, G. R. Spencer, and S. M. Harding. 1982. Simultaneous comparison of three methods for assessing ceftazidime penetration into extravascular fluid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **22**:995–998.
34. Rybak, M. J., E. Bailey, K. Lamp, and G. W. Kaatz. 1992. Pharmacokinetics and bactericidal rates of daptomycin and vancomycin in intravenous drug abusers being treated for gram-positive endocarditis and bacteremia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:1109–1114.
35. Sabath, L. D., C. Garner, C. Wilcox, and M. Finland. 1976. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* to 65 antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **9**:962–969.
36. Schaad, H. J., C. Chuard, P. Vaudaux, P. Rohner, F. A. Waldvogel, and D. P. Lew. 1994. Comparative efficacies of imipenem, oxacillin and vancomycin for therapy of chronic foreign body infection due to methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **33**:1191–1200.
37. Schentag, J., K. Gilliland, and J. A. Paladino. 2001. What have we learned from pharmacokinetic and pharmacodynamic theories? *Clin. Infect. Dis.* **32**(Suppl. 1):39–46.
38. Stewart, P. S., and J. W. Costerton. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**:135–138.
39. Thomas, J., A. Forrest, S. Bhavnani, J. Hyatt, A. Cheng, C. Ballow, and J. Schentag. 1998. Pharmacodynamic evaluation of factors associated with the development of bacterial resistance in acutely ill patients during therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:521–527.
40. Trampuz, A., M. Wenk, Z. Rajacic, and W. Zimmerli. 2000. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of levofloxacin against *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in human skin blister fluid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1352–1355.
41. Tuazon, C. U., M. Y. Lin, and J. N. Sheagren. 1978. In vitro activity of rifampin alone and in combination with nafcillin and vancomycin against pathogenic strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **13**:759–761.
42. Vaudaux, P., P. Francois, C. Bisognano, J. Schrenzel, and D. P. Lew. 2002. Comparison of levofloxacin, alatrofloxacin and vancomycin for prophylaxis and treatment of experimental foreign-body-associated infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1503–1509.
43. Vogelmann, B., S. Gudmundsson, J. Leggett, J. Turnidge, S. Ebert, and W. A. Craig. 1988. Correlation of antimicrobial pharmacokinetic parameters with therapeutic efficacy in an animal model. *J. Infect. Dis.* **158**:831–847.
44. Widmer, A. F., A. Gaechter, P. E. Ochsner, and W. Zimmerli. 1992. Antimicrobial treatment of orthopedic implant-related infections with rifampin combinations. *Clin. Infect. Dis.* **14**:1251–1253.
45. Widmer, A. F., R. Frei, Z. Rajacic, and W. Zimmerli. 1990. Correlation between in vivo and in vitro efficacy of antimicrobial agents against foreign body infections. *J. Infect. Dis.* **162**:96–102.
46. Zimmerli, W., A. F. Widmer, M. Blatter, R. Frei, and P. E. Ochsner. 1998. Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections. *JAMA* **279**:1537–1541.
47. Zimmerli, W., A. Trampuz, and P. E. Ochsner. 2004. Prosthetic-joint infections. *N. Engl. J. Med.* **351**:1645–1654.
48. Zimmerli, W., R. Frei, A. F. Widmer, and Z. Rajacic. 1994. Microbiological test to predict treatment outcome in experimental device-related infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **33**:959–967.

Intracellular antimicrobial activity appearing as a relevant factor in the antibiotic efficacy against an experimental foreign-body infection by *S. aureus*

Running title: Relevant intracellular antibiotic activity

O. Murillo^{1*}, M.E. Pachón¹, G. Euba¹, R. Verdaguer², M. Carreras⁴, C. Cabellos¹, J. Cabo³, F. Gudiol¹, J. Ariza¹

Experimental Infection Laboratory, Infectious Diseases Service¹, Departments of Microbiology², Orthopaedic Surgery³ and Pathology⁴.

IDIBELL, Hosp. Univ. de Bellvitge (Feixa Llarga s/n, 08907, Barcelona-Spain), Barcelona, Spain.

ABSTRACT

The presence of bacterial biofilm, tolerance to antibiotics and dysfunctional activity of phagocytic cells are all related to difficulties in eradicating foreign-body infections. We aimed to quantify the presence of intracellular *S. aureus* and to study the extent to which the intracellular activity of antibiotics might determine their efficacy against an experimental rat tissue-cage model of foreign-body infection.

Using this model, animals were either treated for 7 days with levofloxacin 100 mg/kg/d and cloxacillin 200 mg/kg/12 h, or were left untreated. Antibiotic efficacy was evaluated by means of bacterial counts from tissue-cage fluid; these counts were derived separately in total, intracellular and extracellular bacteria. The presence of intracellular bacteria was checked by electron microscopy. Population analysis was performed with surviving bacteria recovered at the end of levofloxacin therapy.

Among a total number of bacteria (means of log CFU/ml \pm SD) from TCF of 6.86 ± 0.6 , we identified 6.38 ± 0.8 of intracellular and 5.57 ± 0.5 of extracellular bacteria. Levofloxacin was better than cloxacillin ($p < 0.05$) against both intracellular and extracellular bacteria. Differences found in the killing of levofloxacin against the intracellular population showed a tendency to be higher than for the extracellular compartment. The frequency of mutants for levofloxacin was similar between in vivo samples and wild strain.

In conclusion, intracellular bacteria accounted for the largest proportion of total inoculum in this model of foreign-body infection. The intracellular activity of an antibiotic seems to be an additional relevant factor in the antibiotic response to these infections.

INTRODUCTION

Foreign-body infections are difficult to treat and require a combination of long-term antibiotic therapy and surgical intervention to be cured (35). Difficulties in eradicating these infections have been related to several issues such as bacterial biofilm, tolerance to antibiotics, and functional abnormalities in the activity of phagocytic cells that are in contact with the foreign body (8,10,29,34).

The intracellular location of bacteria may be considered an additional mechanism of virulence and this allows the micro-organism to achieve greater protection against humoral defences and antibiotics (15,19,20). However, the potential role of these intracellular micro-organisms in limiting antibiotic efficacy in foreign-body infections is not well known.

Staphylococcus aureus is one of the most frequent micro-organisms responsible for device infections, and it is also able to penetrate and survive within phagocytic cells (12,26,32,35). The existence of intracellular *S. aureus* in the setting of foreign-body infection has recently been related to disease relapse and the presence of more resistant strains (27,31).

The rat model of tissue-cage infection reasonably mimics chronic prosthetic infection and has provided relevant information about the pathogenesis and treatment of foreign-body infections over the last fifteen 15 years (7,18,36). We previously tested the efficacy of several antibiotics alone and in combination against methicillin-susceptible *S. aureus* (21-23).

The aims of the present study were to screen for the presence of and to quantify intracellular *S. aureus* in this rat model of chronic foreign-body infection. We also studied the extent to which intracellular activity of antibiotics may determine their final therapeutic efficacy, using cloxacillin and fluoroquinolones as anti-staphylococcal agents.

MATERIALS AND METHODS

Micro-organism and antibiotic susceptibilities

We used a methicillin-susceptible *S. aureus* ATCC 29213 strain.

The MICs and MBCs ($\mu\text{g/ml}$) were determined according to standard CLSI recommendations (9). They were 0.5 and 1, respectively, for both levofloxacin and cloxacillin.

Animal model

All the methodology was described in detail in our previous reports (22,23). In brief, two Teflon tissue-cages (with two cover-slips each) were subcutaneously implanted in the flank of Wistar rats and three weeks later tissue cage fluid (TCF)

was checked for sterility and then infected with 0.1 ml of *S. aureus* (0.2 to 2×10^6 ufc/ml). After three weeks, more TCF was obtained to perform bacterial counts (day 1) and therapy was intraperitoneally administered for 7 days. A minimum of 10^5 ufc/ml was required to include samples of TCF in therapeutic experiments. Twenty-four hours after the end of treatment (day 8), TCF was again recovered to quantify bacterial counts (see below). Antibiotic efficacy was evaluated by means of differences in bacterial counts from TCF between the beginning and end of therapy.

Therapeutic groups were levofloxacin 100 mg/kg/d, cloxacillin 200 mg/kg/12 h and controls. The dosage of each antibiotic was selected according to previous pharmacokinetic studies and using the methodology previously reported in detail (22). Briefly, a weight-adjusted drug dose was administered to a group of healthy rats, and samples of serum and TCF were then obtained at several time-points to determine the concentration-time relationships and the main pharmacokinetic parameters using a bioassay method (6). The most appropriate dosage in rats was selected on the basis of previous data about the relationships in drug concentrations between extravascular fluids and serum in our model: 1) the area under the concentration-time curve (AUC) is similar in both TCF and serum; and 2) peak concentrations and the time the drug concentration remained above the MIC in TCF tend to be lower and longer than in serum, respectively (11,30).

For the particular case of levofloxacin we adjusted the AUC values in rats to those reported for high doses of levofloxacin in humans (750-1000 mg/d). For cloxacillin we selected the dosage in rats by ensuring $T > \text{MIC}$ 100% in TCF, which was equivalent to conventional dose in human serum.

The main pharmacokinetic parameters and their relationships to MIC were reported in our previous papers (22). The C_{max} and AUC/MIC in TCF and serum were, respectively, 12 mg/L, 234 and 38, 212 for levofloxacin 100 mg/kg/d; the C_{max} and $T > \text{MIC}$ in TCF and serum were, respectively, 43, 100% and 68, 21% for cloxacillin.

Bacterial counts of total, intra- and extracellular bacteria

The TCF recovered from infected animals was divided into two samples, both of which were processed in parallel to quantify bacterial counts.

1) TCF was sonicated (150 W x 1 min; Afora, Madrid, Spain) and 100 μl of this fluid and its 10-fold dilutions were cultured on Mueller-Hinton agar (MHA) plates and incubated for 48 h at 37°

to quantify bacterial counts (total bacteria) (18,22).

2) The other sample of TCF was centrifuged (100 g x 5 min) to separate the pellet and the supernatant in order to quantify the intracellular and extracellular bacterial counts, respectively (16). The pellet was resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) and exposed to gentamicin (100 µg/ml for 2 h; Sigma-Aldrich), an antibiotic that does not penetrate eukaryotic cells. Gentamicin was then removed by washing twice with PBS, before disrupting the cells by sonication. Finally, 100 µl of this fluid and its 10-fold dilutions were cultured as above to quantify bacterial counts (intracellular bacteria). The supernatant from TCF was filtered (FS Bioblock, 5 µm) and checked for the absence of leucocytes (using Turk solution); this filtered fluid was cultured as indicated above to quantify the bacterial counts (extracellular bacteria).

To count the number of leukocytes from TCF, 10 µl of each sample was diluted 1:1 with Turk solution (acetic acid and Methylene Blue prepared in-house) and read with a Neubauer camera under an optical microscope.

Population analysis of surviving bacteria

For samples from the levofloxacin group we analysed the surviving population following the recommended methodology (17). Briefly, viable bacteria recovered from TCF at the end of levofloxacin therapy were cultured overnight in Trypticase soy broth (TSB), before being resuspended in Mueller-Hinton broth and adjusted to an inoculum of 10^{10} cfu/ml. A sample of 100 µl of this fluid and its 10-fold dilutions were inoculated in agar plates containing several levofloxacin concentrations (0.5, 0.6, 0.8, and 1 µg/ml). The plates were incubated at 37° for 48 h and the number of colonies was counted.

Electron microscopy

All the procedures followed the recommended methodology (14). Pellets of cells from gentamicin-treated TCF were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M PBS (pH 7.4). Cells were then washed in PBS buffer and dehydrated through a graded ethanol series. Finally the pellets were embedded in resin, thin sectioned and examined with an electron microscope (JEOL 1011).

Statistical analysis

All bacterial counts are presented as log cfu/ml (means ± standard deviation). Differences in bacterial counts for treated and untreated animals were analysed for statistical significance using analysis of variance (ANOVA). An unpaired Student's T test with the Bonferoni correction was used post hoc to determine statistical significance.

The killing rate constant (k) was calculated by applying the equation $k = \ln N_t - \ln N_0 / t$, where N_0 is the number of viable bacteria at time 0 and N_t is this number at time t .

For all tests, differences were considered statistically significant when p values were < 0.05.

RESULTS

Preliminary studies were performed in order to check the accuracy of the methodology for identifying different bacterial populations.

After 3 weeks of infection the total bacterial count in TCF (mean log cfu/ml ± SD) was 6.86 ± 0.6 (n=10); the mean of leukocyte counts from TCF at day 1 was $3.6 \times 10^9/L$. We separated the intra- and extra-cellular bacterial populations from these TCFs and both were exposed to gentamicin for 2 h to ensure that each population was killed in a different manner. Results of bacterial counts before and after exposure to gentamicin were, respectively, 6.47 ± 0.8 and 6.38 ± 0.8 for intracellular bacteria, and 5.57 ± 0.5 and 3.48 ± 0.2 for extracellular ones (Figure 1). We observed that the largest proportion of bacteria had an intracellular location and that treatment with gentamicin did not significantly kill these intracellular bacteria, in contrast to what occurred with extracellular ones (killing > 2 log CFU/ml at 2 h). All procedures were confirmed to be harmless for bacteria. Figure 2 shows the presence of intracellular *S. aureus* after gentamicin exposure using electron microscopy. Once all the methodology had been checked and standardised we conducted therapeutic experiments. At day 1 there were no significant differences between the groups in bacterial counts for each compartment. These bacterial counts (means of log CFU/ml ± SD for total, intra- and extra-cellular bacteria) were, respectively: 6.72 ± 0.9 , 6.3 ± 1 , and 5.6 ± 0.9 for controls (n=12); 7 ± 0.5 , 6.5 ± 0.5 , and 5.5 ± 0.6 for levofloxacin (n=17); and 6.9 ± 0.8 , 6.3 ± 0.9 , and 5.5 ± 0.8 for cloxacillin (n=18).

At the end of treatment both therapeutic groups were better than controls (p<0.05). We again noted that the largest proportion of bacteria after therapy had an intracellular location and that they remained viable. Levofloxacin was better than cloxacillin (p<0.05); activity against intracellular and extracellular bacteria was analysed separately and showed significantly greater efficacy for levofloxacin in both compartments (p<0.05) when compared to cloxacillin. A comparison between groups in terms of bacterial counts from each compartment is represented in Figure 3.

Killing rates (k) against intracellular and extracellular bacteria were, respectively, 0.0296 h^{-1} and 0.0239 h^{-1} for levofloxacin, and 0.0173 h^{-1} and 0.014 h^{-1} for cloxacillin. We noted that the

levofloxacin killing rate was even greater against intracellular than against extracellular bacteria, although this difference was not statistically significant ($p=0.1$).

Population analysis ($n=8$) of surviving bacteria at the end of levofloxacin therapy showed no changes in initial MIC. The frequency of mutants growing on agar plates with 0.5 and 0.6 $\mu\text{g/ml}$ of levofloxacin was, respectively: 6.7×10^{-8} and 3.46×10^{-8} for in vivo samples ($n=8$), and 8.05×10^{-8} and 9×10^{-9} for wild strain Hungarian. No mutant colonies were grown on plates containing 0.8 or 1 $\mu\text{g/ml}$ of levofloxacin.

DISCUSSION

Bacterial biofilms determine the limited efficacy of antibiotics in foreign-body infections. However, it is difficult to establish the extent to which this limitation is due to bacterial phenotypic tolerance to antibiotics, to the presence of inactivating factors within the biofilm, or to the biofilm acting as a physical barrier.

Animal studies with the tissue-cage model for infection by *S. aureus* have repeatedly emphasised the relevance of bacterial tolerance to antibiotics as the main factor underlying these therapeutic problems. In this model, bacterial isolates from TCF, which probably come from the continuous turnover established with the adjacent biofilm, show a phenotypic antimicrobial tolerance (8). Thus, in vitro bactericidal activity of antibiotics against stationary phase bacteria has been considered the best marker of their efficacy in vivo (4,33), as we reported for levofloxacin and rifampin in comparison to cloxacillin, vancomycin and linezolid (22).

Additionally, the presence of dysfunctional leukocytes with viable intracellular bacteria has been related to the inability to prevent experimental foreign-body infections and the maintenance of these established infections (25,34,36). Furthermore, the presence of intracellular *S. aureus* in some phenotypic forms, such as small colony variants, has recently been reported as the cause of relapses in human orthopaedic prosthetic infections (27,31). Indeed, in the specific case of systemic and localised *S. aureus* infections, the particular ability of the micro-organism to survive inside the professional and non-professional phagocytes, such as endothelial cells, osteoblasts and others, has been related to the persistence and relatively high frequency of relapses after appropriate antimicrobial therapy (3,12,32).

In the present study we were surprised to find that most of the micro-organisms isolated from TCF were identified as intracellular bacteria, which

was in agreement with that reported in a previous study but in a higher proportion (13). Although these authors reported how these bacteria increased at the end of antibiotic therapy with respect to untreated animals, we found that this population was already very prevalent at the beginning of treatment. We believe that the methodology used to differentiate the extracellular and intracellular location of *S. aureus* in our study was suitable, given the electronic microscopic observations and the behaviour of the addition of gentamicin, known to have no significant intracellular anti-staphylococcal activity. It is likely, therefore, that our model of a chronic three-week-old device infection mimics well a localised purulent prosthetic device infection.

When the efficacy of antimicrobial therapy was evaluated, interesting differences between extracellular and intracellular compartments were observed. The greater efficacy of levofloxacin compared to cloxacillin was found in both compartments, but it was even greater in the intracellular one. Differences observed in the extracellular population were probably related to the higher tolerance to cloxacillin found in this *S. aureus* population in comparison to that for levofloxacin. Differences found in the killing rate against the intracellular population showed a tendency to be higher than for the extracellular compartment; in all likelihood this suggests an additional role for this intracellular location in the limited antibiotic efficacy against foreign-body infections. One limitation when interpreting our results is the probable continuous turnover between intracellular and extracellular populations; however, since the presence of viable intracellular bacteria is highly relevant at both the beginning and end of treatment it seems reasonable to assume that the better intracellular killing of the antibiotic represents greater efficacy. Several studies have reported that all antibiotics have reduced activity against intracellular *S. aureus*, not only due to the difficulty of the antibiotic reaching the micro-organism in its intracellular location, but also because phenotypic changes in this location confer greater antibiotic resistance (5,19). However, the behaviour of each family of antibiotics in the intracellular milieu has been significantly differentiated, with fluoroquinolones achieving greater activity in comparison to beta-lactams (2,20,28). In particular, levofloxacin showed one of the best intracellular activities against *S. aureus* and this in vitro intracellular killing of drugs correlated well with their in vivo efficacy in experimental abscesses (1,24). Our results regarding efficacy are consistent with the good intracellular killing of levofloxacin, and our analyses of viable

bacteria at the end of treatment also support the lack of development of resistance in this location.

In conclusion, we have noted that the intracellular bacterial inoculum represents the most important fraction of the total inoculum even at the end of antibiotic treatment. In the context of an experimental model of foreign-body infection, both phenotypic tolerance to antimicrobials and the intracellular location of micro-organisms appear to determine the limited efficacy of antibiotics. The intracellular activity of an antibiotic seems to be a relevant factor in the antibiotic response to this kind of infection.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank V. Moreno from the Universitat de Barcelona for his assistance with the statistical analysis; and C. Jimenez from the Hospital Universitari de Bellvitge for her technical assistance with the electron microscopy. This work was supported by a research grant from the Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III (FIS 04/005) and grants from the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI C03/14; REIPI RD06/0008). O. M. was supported by a grant from the REIPI.

REFERENCES

1. **Bamberger, D. M., M. T. Fields, and B. L. Herndon.** 1991. Efficacies of various antimicrobial agents in treatment of Staphylococcus aureus abscesses and correlation with in vitro tests of antimicrobial activity and neutrophil killing. *Antimicrob.Agents Chemother.* **35**:2335-2339.
2. **Barcia-Macay, M., C. Seral, M. P. Mingeot-Leclercq, P. M. Tulkens, and B. F. Van.** 2006. Pharmacodynamic evaluation of the intracellular activities of antibiotics against Staphylococcus aureus in a model of THP-1 macrophages. *Antimicrob.Agents Chemother.* **50**:841-851.
3. **Bayles, K. W., C. A. Wesson, L. E. Liou, L. K. Fox, G. A. Bohach, and W. R. Trumble.** 1998. Intracellular Staphylococcus aureus escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect.Immun.* **66**:336-342.
4. **Blaser, J., P. Vergeres, A. F. Widmer, and W. Zimmerli.** 1995. In vivo verification of in vitro model of antibiotic treatment of device-related infection. *Antimicrob.Agents Chemother.* **39**:1134-1139.
5. **Carryn, S., H. Chanteux, C. Seral, M. P. Mingeot-Leclercq, B. F. Van, and P. M. Tulkens.** 2003. Intracellular pharmacodynamics of antibiotics. *Infect.Dis.Clin.North Am.* **17**:615-634.
6. **Chapin-Robertson K, and S. C. Edberg.** 1991. Measurements of antibiotics in human body fluids: techniques and significance, p. 295-366. *In V. Lorian (ed.), Antibiotics in laboratory medicine.* Williams and Wilkins, New York.
7. **Chuard, C., M. Herrmann, P. Vaudaux, F. A. Waldvogel, and D. P. Lew.** 1991. Successful therapy of experimental chronic foreign-body infection due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus by antimicrobial combinations. *Antimicrob.Agents Chemother.* **35**:2611-2616.
8. **Chuard, C., J. C. Lucet, P. Rohner, M. Herrmann, R. Auckenthaler, F. A. Waldvogel, and D. P. Lew.** 1991. Resistance of Staphylococcus aureus recovered from infected foreign body in vivo to killing by antimicrobials. *J.Infect.Dis.* **163**:1369-1373.
9. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2005. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, 6th ed., M7-A6. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA.
10. **Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg.** 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**:1318-1322.
11. **Craig, W. A.** 1998. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin.Infect.Dis.* **26**:1-10.
12. **Ellington, J. K., M. Harris, M. C. Hudson, S. Vishin, L. X. Webb, and R. Sherertz.** 2006. Intracellular Staphylococcus aureus and antibiotic

- resistance: implications for treatment of staphylococcal osteomyelitis. *J.Orthop.Res.* **24**:87-93.
13. **Espersen, F., N. Frimodt-Moller, L. Corneliussen, U. Riber, V. T. Rosdahl, and P. Skinhoj.** 1994. Effect of treatment with methicillin and gentamicin in a new experimental mouse model of foreign body infection. *Antimicrob.Agents Chemother.* **38**:2047-2053.
 14. **Graham, L. and J. M. Orenstein.** 2007. Processing tissue and cells for transmission electron microscopy in diagnostic pathology and research. *Nat.Protoc.* **2**:2439-2450.
 15. **Gresham, H. D., J. H. Lowrance, T. E. Caver, B. S. Wilson, A. L. Cheung, and F. P. Lindberg.** 2000. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J.Immunol.* **164**:3713-3722.
 16. **Hampton, M. B., M. C. Vissers, and C. C. Winterbourn.** 1994. A single assay for measuring the rates of phagocytosis and bacterial killing by neutrophils. *J.Leukoc.Biol.* **55**:147-152.
 17. **Hiramatsu, K., N. Aritaka, H. Hanaki, S. Kawasaki, Y. Hosoda, S. Hori, Y. Fukuchi, and I. Kobayashi.** 1997. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* **350**:1670-1673.
 18. **Lucet, J. C., M. Herrmann, P. Rohner, R. Auckenthaler, F. A. Waldvogel, and D. P. Lew.** 1990. Treatment of experimental foreign body infection caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **34**:2312-2317.
 19. **Maurin, M. and D. Raoult.** 1996. Optimum treatment of intracellular infection. *Drugs* **52**:45-59.
 20. **Maurin, M. and D. Raoult.** 1997. Intracellular organisms. *Int.J.Antimicrob.Agents* **9**:61-70.
 21. **Murillo, O., A. Domenech, G. Euba, R. Verdaguier, F. Tubau, J. Cabo, C. Cabellos, F. Gudiol, and J. Ariza.** 2008. Efficacy of linezolid alone and in combination with rifampin in staphylococcal experimental foreign-body infection. *J.Infect.* **57**:229-235.
 22. **Murillo, O., A. Domenech, A. Garcia, F. Tubau, C. Cabellos, F. Gudiol, and J. Ariza.** 2006. Efficacy of high doses of levofloxacin in experimental foreign-body infection by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **50**:4011-4017.
 23. **Murillo, O., M. E. Pachon, G. Euba, R. Verdaguier, F. Tubau, C. Cabellos, J. Cabo, F. Gudiol, and J. Ariza.** 2008. Antagonistic effect of rifampin on the efficacy of high-dose levofloxacin in staphylococcal experimental foreign-body infection. *Antimicrob.Agents Chemother.* **52**:3681-3686.
 24. **Nguyen, H. A., J. Grellet, D. Paillard, V. Dubois, C. Quentin, and M. C. Saux.** 2006. Factors influencing the intracellular activity of fluoroquinolones: a study using levofloxacin in a *Staphylococcus aureus* THP-1 monocyte model. *J.Antimicrob.Chemother.* **57**:883-890.
 25. **Proctor, R. A., J. M. Balwit, and O. Vesga.** 1994. Variant subpopulations of *Staphylococcus aureus* as cause of persistent and recurrent infections. *Infect.Agents Dis.* **3**:302-312.
 26. **Rogers, D. E., and R. Tompsett.** 1952. The survival of staphylococci within human leukocytes. *J.Exp.Med.* **95**:209-230.
 27. **Sendi, P., M. Rohrbach, P. Graber, R. Frei, P. E. Ochsner, and W. Zimmerli.** 2006. *Staphylococcus aureus* small colony variants in prosthetic joint infection. *Clin.Infect.Dis.* **43**:961-967.
 28. **Seral, C., M. Barcia-Macay, M. P. Mingeot-Leclercq, P. M. Tulkens, and B. F. Van.** 2005. Comparative activity of quinolones (ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin and garenoxacin) against extracellular and intracellular infection by *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in J774 macrophages. *J.Antimicrob.Chemother.* **55**:511-517.

29. **Stewart, P. S. and J. W. Costerton.** 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**:135-138.
30. **Trampuz, A., M. Wenk, Z. Rajacic, and W. Zimmerli.** 2000. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of levofloxacin against *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in human skin blister fluid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1352-1355.
31. **Vaudaux, P., W. L. Kelley, and D. P. Lew.** 2006. *Staphylococcus aureus* small colony variants: difficult to diagnose and difficult to treat. *Clin. Infect. Dis.* **43**:968-970.
32. **Vesga, O., M. C. Groeschel, M. F. Otten, D. W. Brar, J. M. Vann, and R. A. Proctor.** 1996. *Staphylococcus aureus* small colony variants are induced by the endothelial cell intracellular milieu. *J. Infect. Dis.* **173**:739-742.
33. **Widmer, A. F., R. Frei, Z. Rajacic, and W. Zimmerli.** 1990. Correlation between in vivo and in vitro efficacy of antimicrobial agents against foreign body infections. *J. Infect. Dis.* **162**:96-102.
34. **Zimmerli, W., P. D. Lew, and F. A. Waldvogel.** 1984. Pathogenesis of foreign body infection. Evidence for a local granulocyte defect. *J. Clin. Invest* **73**:1191-1200.
35. **Zimmerli, W., A. Trampuz, and P. E. Ochsner.** 2004. Prosthetic-joint infections. *N. Engl. J. Med.* **351**:1645-1654.
36. **Zimmerli, W., F. A. Waldvogel, P. Vaudaux, and U. E. Nydegger.** 1982. Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model. *J. Infect. Dis.* **146**:487-497.

FIGURE 1. Bacterial counts (means log cfu/ml) before (pre) and after (post) exposure to gentamicin (100 µg/ml for 2 h) for intra- and extracellular compartments. Abbreviations: Intrac (intracellular bacteria), Extrac (extracellular bacteria), Total (total bacteria).

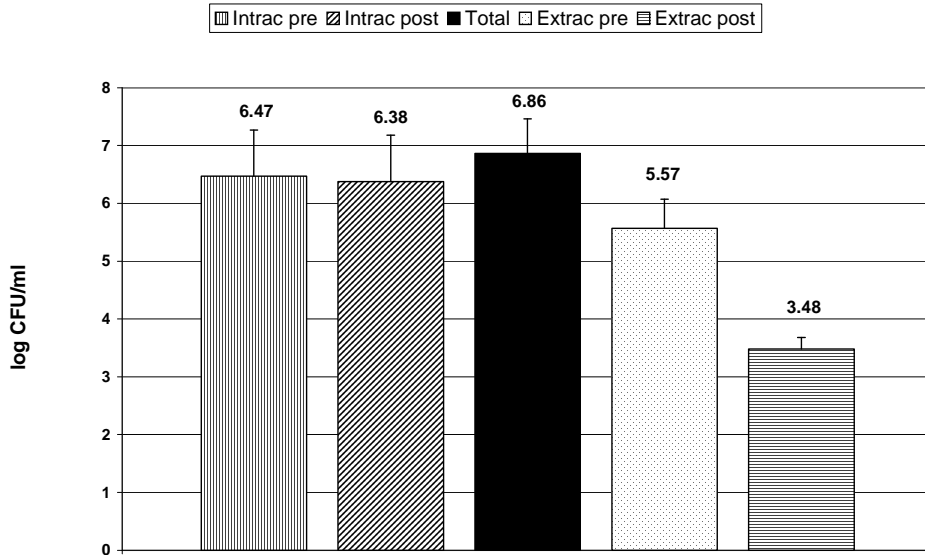


FIGURE 2. Transmission electron micrographs of a phagocytic cell in vivo infected with *S. aureus* after 3 weeks of spontaneous evolution. (A) *S. aureus* micro-organisms (white arrow) are free within the cytoplasm. Magnification, X 40,000 (A). (B) *S. aureus* micro-organism (white arrow) within a vacuole. Magnification, X 40,000 (B).

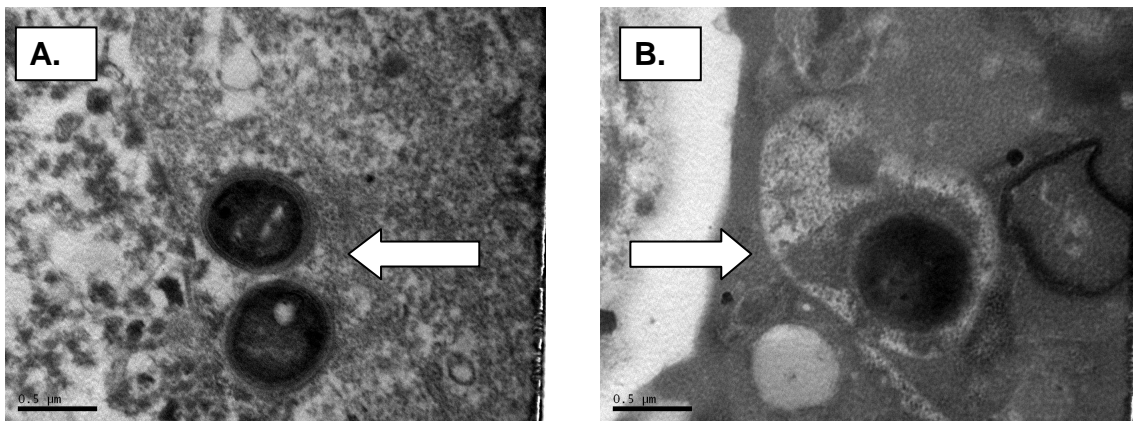
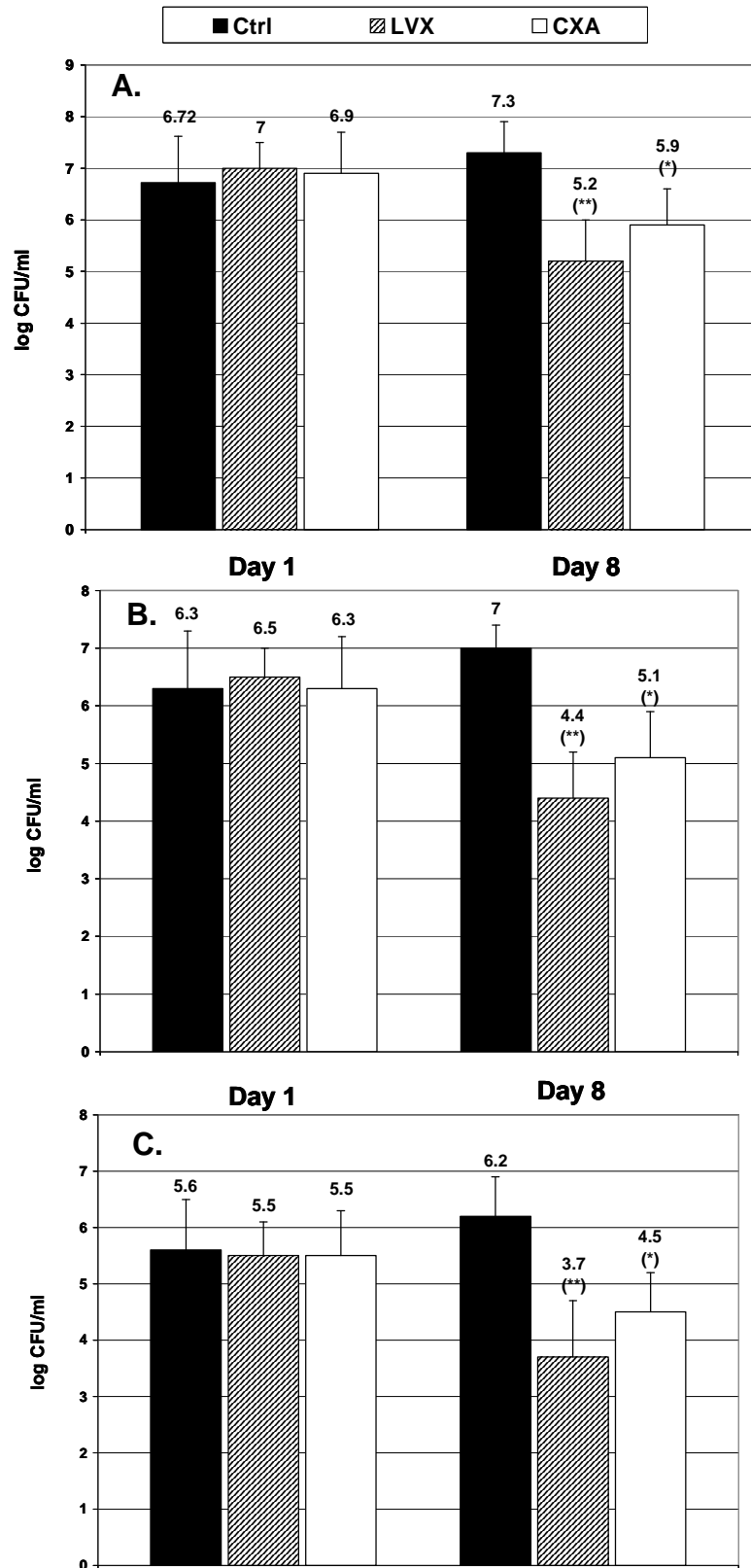


FIGURE 3. Comparison between groups of bacterial counts from TCF analysed separately for total (panel A), intracellular (panel B) and extracellular bacteria (panel C) at the beginning (day 1) and the end of treatment (day 8). Abbreviations: Ctrl (controls), LVX (levofloxacin), CXA (cloxacillin); * $p < 0.05$ vs. controls; ** $p < 0.05$ vs. controls and vs. cloxacillin.



OBJETIVO SEGUNDO.**Estudiar y evaluar la eficacia comparativa de diversas monoterapias de tratamiento antiestafilocócico en la infección de cuerpo extraño.**

Artículo 1. O. Murillo, A. Domenech, A. Garcia, F. Tubau, C. Cabellos, F. Gudiol, J. Ariza. "Efficacy of high doses of levofloxacin in experimental foreign-body infection by methicillin-susceptible *S. aureus*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2006; 50:4011-4017.

En respuesta al objetivo planteado, los aspectos fundamentales de estudio y sus resultados son clasificados en los apartados siguientes:

- 2.a/ evaluación de la eficacia de diversas monoterapias de tratamiento antiestafilocócico.
- 2.b/ correlación de los resultados *in vitro-in vivo*. Actividad *in vitro* de rifampicina.

2.a/ Evaluación de la eficacia de diversas monoterapias de tratamiento antiestafilocócico.

Los resultados obtenidos ocupan la parte central del Artículo 1. En este trabajo se analizó la eficacia comparativa de levofloxacino en dos dosificaciones (50 mg/kg/d y 100 mg/kg/d, equivalentes a dosis humanas de 500 y 750-1000 mg/d, respectivamente), cloxacilina, vancomicina, rifampicina y linezolid. Los principales parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos para todos los antibióticos se han mostrado anteriormente en la Tabla V.1.

En la Tabla V.2 se muestran las CMI y CMBs en fase exponencial y estacionaria de los distintos antibióticos utilizados.

Antibiótico	Fase exponencial		Fase estacionaria
	CMI	CMB	CMB
Cloxacilina	0,5	1	> 256
Vancomicina	2	4	> 256
Linezolid	4	64	> 256
Levofloxacino	0,5	1	4
Rifampicina	0,015	0,12	> 8

Tabla V.2. CMI y CMBs ($\mu\text{g/ml}$) en ambas fases de crecimiento de los diferentes antibióticos utilizados en el estudio. La CMB en fase exponencial de rifampicina se apreció exclusivamente cuando el inóculo inicial se ajustaba a 1×10^5 UFC/ml.

La actividad bactericida *in vitro* de los antibióticos en solitario se estudió mediante curvas de letalidad en fase exponencial y fase estacionaria de crecimiento; en la Figura V.9 se muestran los resultados: fase exponencial - concentraciones por encima de la CMI clínicamente alcanzables; fase estacionaria - concentraciones pico en el líquido de las cajas. En conjunto, las curvas de letalidad mostraron actividad bactericida en fase exponencial para levofloxacino, cloxacilina y vancomicina a concentraciones $2 \times \text{CMI}$, y para linezolid a altas concentraciones ($\geq 16 \times \text{CMI}$) que equivalen a niveles no alcanzables en la práctica clínica con dosis convencionales. En fase estacionaria únicamente levofloxacino fue bactericida aunque a concentraciones mayores ($8 \times \text{CMI}$). Rifampicina no alcanzó efecto bactericida en ninguna de las dos fases y se apreció el desarrollo de resistencia al final de los experimentos; esto fue motivo de posteriores trabajos para estudiar con más detalle la actividad *in vitro* de rifampicina.

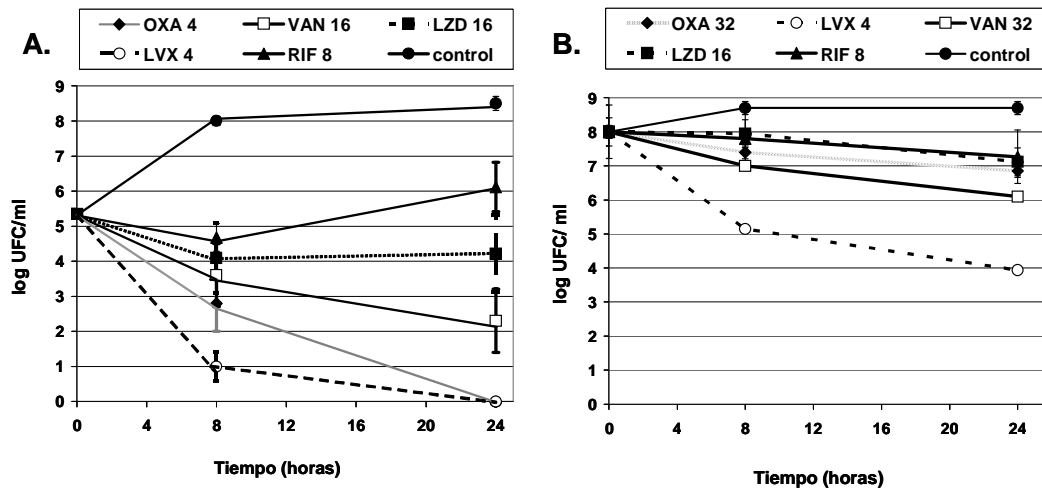


Figura V.9. Curvas de letalidad de 24h en fase exponencial (A) y estacionaria (B) con concentraciones clínicamente alcanzables de los distintos antibióticos ($\mu\text{g/ml}$). Las barras de error muestran la desviación estándar. Abreviaturas: OXA, cloxacilina; VAN, vancomicina; LZD, linezolid; LVX, levofloxacino; RIF, rifampicina.

Respecto a la eficacia *in vivo* de los distintos antibióticos en monoterapia, todos los tratamientos fueron mejores que el grupo control y levofloxacino a altas dosis fue el tratamiento más eficaz siendo significativamente mejor que linezolid ($P = 0,03$). Rifampicina, el segundo antibiótico más activo, se confirmó como un tratamiento eficaz en la infección de cuerpo extraño a pesar de aparecer resistencia en el 60% de los casos. Linezolid se mostró menos eficaz que las otras alternativas y no se desarrolló resistencia en el curso de su tratamiento. En la Figura V.10 se representan estos resultados de eficacia.

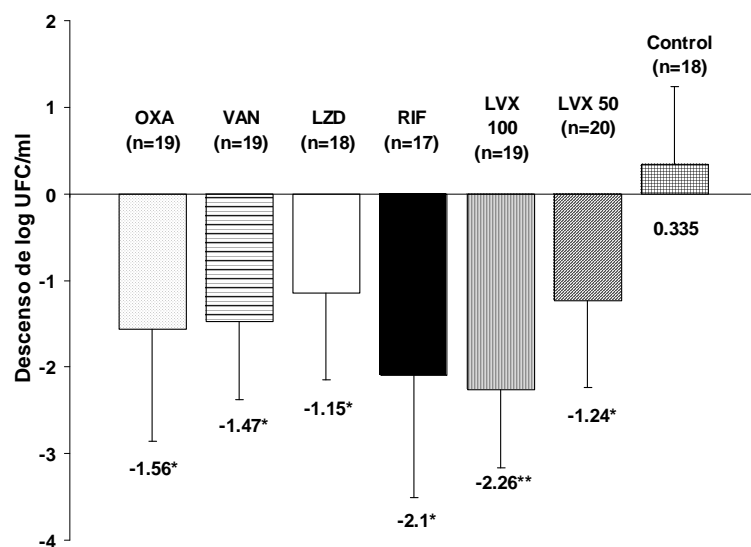


Figura V.10. Descensos de los recuentos bacterianos (media de log UFC/ml \pm desviación estándar) del líquido de las cajas al final del tratamiento para cada uno de los grupos terapéuticos. Abreviaturas como el la Figura anterior. * $P < 0.05$ vs. controles; ** $P = 0.03$ vs LZD y $P < 0.05$ vs controles.

De los resultados obtenidos fue especialmente interesante las diferencias observadas con las dos dosificaciones de levofloxacino. Este antibiótico a altas dosis mostró una gran eficacia antiestafilocócica frente a bacterias en fase estacionaria (*in vitro*) y bacterias asociadas al cuerpo extraño (*in vivo*), lo cual se relacionó con sus parámetros farmacodinámicos (AUC/CMI 234 para levofloxacino 100, frente a AUC/CMI 136 para levofloxacino 50). Utilizado a altas dosis, levofloxacino se mostró igual de eficaz que rifampicina que está considerada como tratamiento referente en las infecciones de cuerpo extraño.

2.b/ Correlación de los resultados *in vitro-in vivo*. Actividad *in vitro* de rifampicina.

Los resultados de eficacia terapéutica *in vivo* fueron comparados con los obtenidos en los estudios *in vitro* mediante el porcentaje de bacterias erradicadas y observamos cómo existía una mayor correlación con los resultados en fase estacionaria;

estos resultados son comentados en el Artículo 1 y se muestran gráficamente en la Figura V.11.

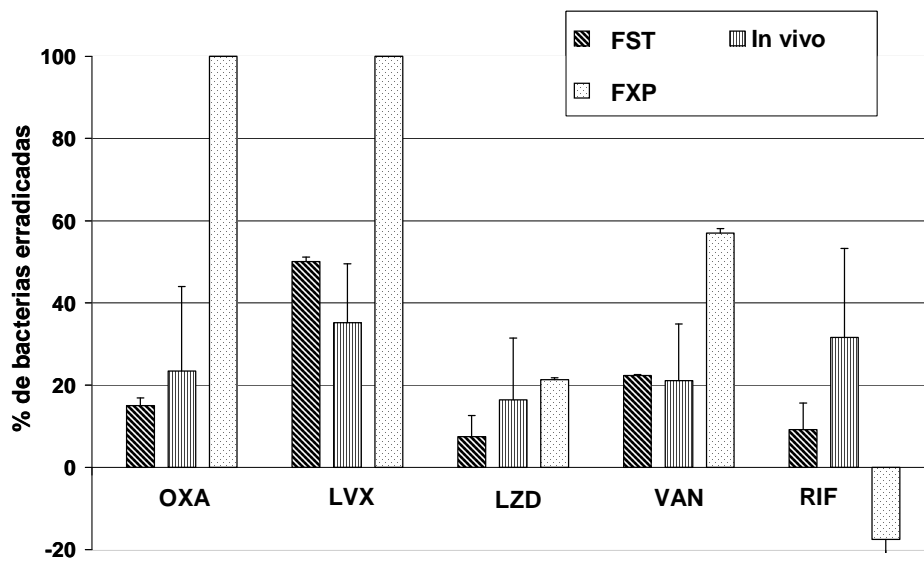


Figura V.11. Relaciones entre los porcentajes de bacterias erradicadas in vivo, *in vitro* en fase exponencial (FXP) e *in vitro* en fase estacionaria (FST). Las concentraciones de antibiótico ($\mu\text{g/ml}$) en FXP y FST son, respectivamente, 4/32 cloxacilina (OXA), 4/4 levofloxacino (LVX), 16/16 linezolid (LZD), 16/32 vancomicina (VAN) y 8/8 rifampicina (RIF). Las barras de error representan la desviación estándar.

La mayor discrepancia fue debida a los resultados obtenidos con rifampicina, con una alta eficacia *in vivo* y poca *in vitro* en las dos fases; si se excluían sus resultados los estudios en fase estacionaria predecían aún mejor los obtenidos *in vivo* ($r^2=0.92$, $p<0.05$) mostrándose como un método *in vitro* más útil para aportar información sobre la eficacia antimicrobiana en la infección de cuerpo extraño (Figura V.12).

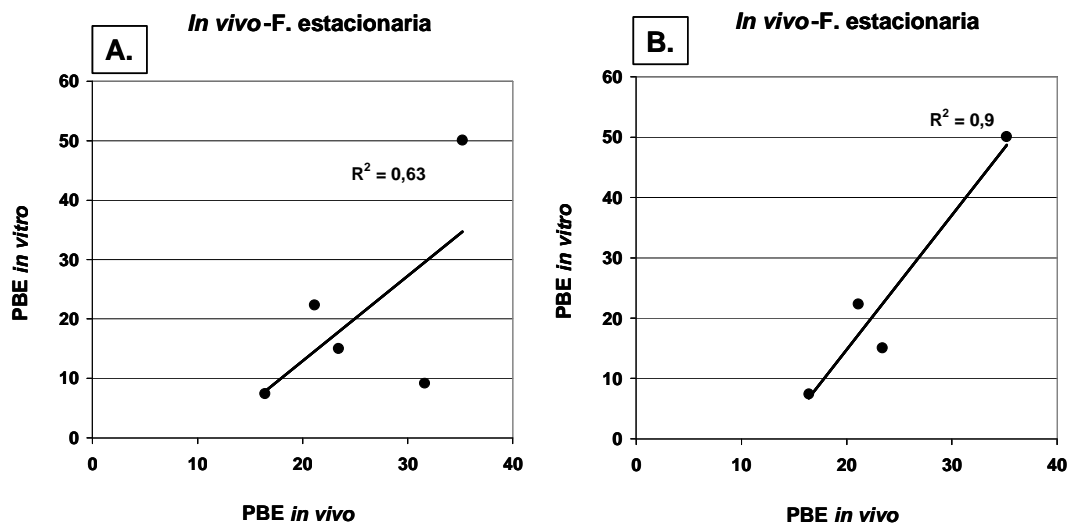


Figura V.12. Correlación entre la eficacia terapéutica *in vivo* y la actividad *in vitro* en fase estacionaria para cloxacilina, levofloxacino, vancomicina, linezolid y rifampicina (A) y para los mismos antibióticos excepto rifampicina (B). PBE: porcentaje de bacterias erradicadas; obtenido en base a la reducción de recuentos bacterianos en log CFU/ml al final del experimento respecto del inóculo inicial.

Nuestros resultados sobre la actividad *in vitro* de rifampicina, en especial la dificultad para mostrar su actividad bactericida, fueron contrastados con la literatura existente y confirmamos la presencia de resultados contradictorios. Ello motivó nuevos estudios con curvas de letalidad frente a diversas cepas bacterianas de *S. aureus*, meticilín sensible y resistente, para comprobar si existía un comportamiento distinto en función de la cepa. Los resultados de estos trabajos nos permitieron clarificar que la actividad *in vitro* de rifampicina se veía enormemente alterada por las variaciones en el tamaño del inóculo utilizado y por la aparición de resistencias. Rifampicina se mostró bactericida exclusivamente cuando el inóculo fue ajustado a 10^5 UFC/ml en fase exponencial, mientras que pequeños aumentos en el tamaño del inóculo produjeron una actividad final bacteriostática o bien recrecimiento bacteriano por resistencia. Por los mismos motivos, en los estudios *in vitro* en fase estacionaria donde son necesarios inóculos altos tampoco se apreció actividad bactericida, aunque la actividad final fue

similar a la de fase exponencial con inóculos mayores de 1×10^5 UFC/ml (generalmente descensos de 1,5-2 log UCF/ml). Estos resultados frente a la cepa de estudio SAMS 29213 se muestran resumidos en la Figura V.13. Finalmente, concluimos que la problemática para objetivar la actividad bactericida antiestafilocócica de rifampicina no fue claramente cepa dependiente.

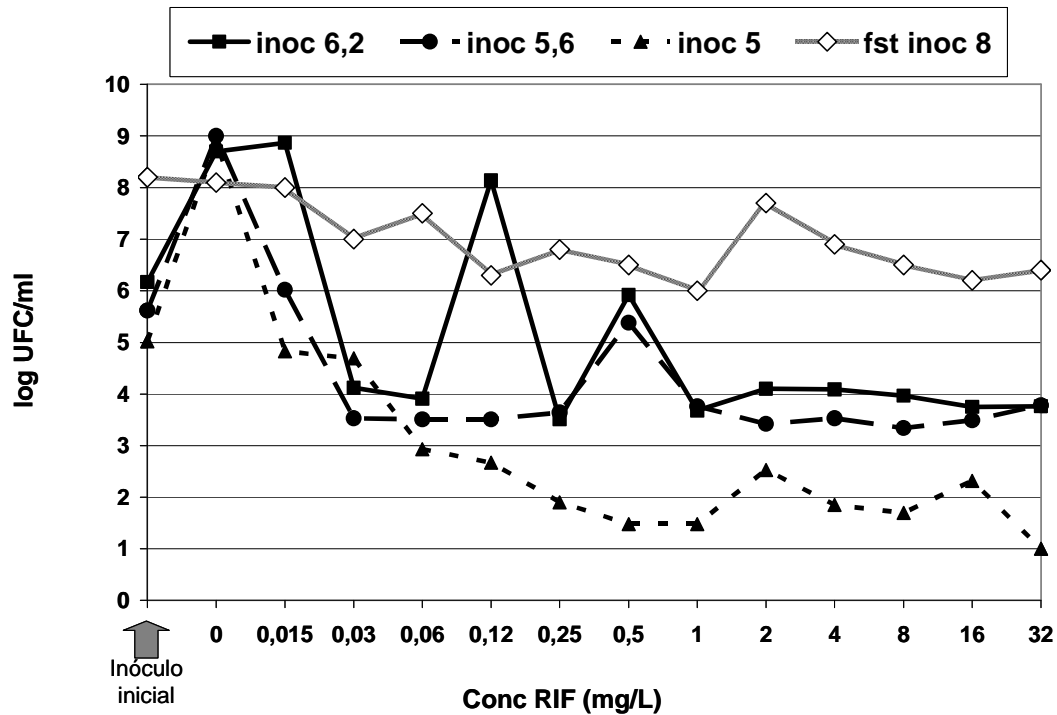


Figura V.13. Recuentos bacterianos para distintas concentraciones de rifampicina (RIF) frente a *S. aureus* ATCC 29213 obtenidos en fase exponencial con inóculos iniciales de $1,6 \times 10^6$ UFC/ml (inoc 6,2), 4×10^5 UFC/ml (inoc 5,6) y 1×10^5 UFC/ml (inoc 5), y en fase estacionaria con inóculo de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml (fst inoc 8). Únicamente se objetivó actividad bactericida (descensos de recuentos bacterianos > 3 log) cuando el inóculo fue estrictamente ajustado a 5 logUFC/ml; en los otros casos se puede apreciar el recrecimiento bacteriano o bien la actividad bacteriostática.

OBJETIVO TERCERO.

Estudiar la eficacia de las nuevas fluoroquinolonas y su relación con los parámetros farmacodinámicos.

Artículo 3. O. Murillo, ME. Pachón, G. Euba, R. Verdaguer, F. Tubau, C. Cabellos, J. Cabo, F. Gudiol, J. Ariza. "High doses of levofloxacin vs moxifloxacin against staphylococcal experimental foreign-body infection: the effect of higher MIC-related pharmacokinetic parameters on efficacy." *Journal of Infection* 2009; 58:220-226.

Este fue el objetivo principal de estudio del Artículo 3. El punto de partida fueron los buenos resultados de eficacia obtenidos con levofloxacino a altas dosis beneficiándose de unos parámetros farmacodinámicos mejores que con dosis convencionales. En este trabajo se comparó la eficacia de levofloxacino a altas dosis (equivalente a la dosis de 750-1000 mg/d en humanos) frente a dos dosificaciones de moxifloxacino (equivalentes a 400 mg/d y 800 mg/d en humanos) que aseguraban unos parámetros farmacodinámicos aún mayores que levofloxacino.

En los estudios *in vitro* determinamos las CMI, CMBs y CPMs para levofloxacino y moxifloxacino (Tabla V.3) y se realizaron curvas de letalidad.

Antibiótico	CMI	CMB (F.exp)	CMB (F.est)	CPM
Levofloxacino	0.5	1	4	0.8
Moxifloxacino	0.12	0.25	2	0.25

Tabla V.3. CMI, CMB en fase exponencial (F.exp), CMB en fase estacionaria (F.est) y CPMs para levofloxacino y moxifloxacino. Todas las concentraciones de antibiótico están expresadas en $\mu\text{g/ml}$.

En las curvas de letalidad, tanto levofloxacino como moxifloxacino mostraron actividad bactericida frente a bacterias en ambas fases de crecimiento si bien necesitaron concentraciones mayores en fase estacionaria (Figura V.14). Ambas fluoroquinolonas consiguieron una actividad bactericida en fase exponencial a concentraciones $2 \times \text{CMI}$; mientras que en fase estacionaria fue alcanzada por levofloxacino en la concentración $8 \times \text{CMI}$ y por moxifloxacino en $16 \times \text{CMI}$.

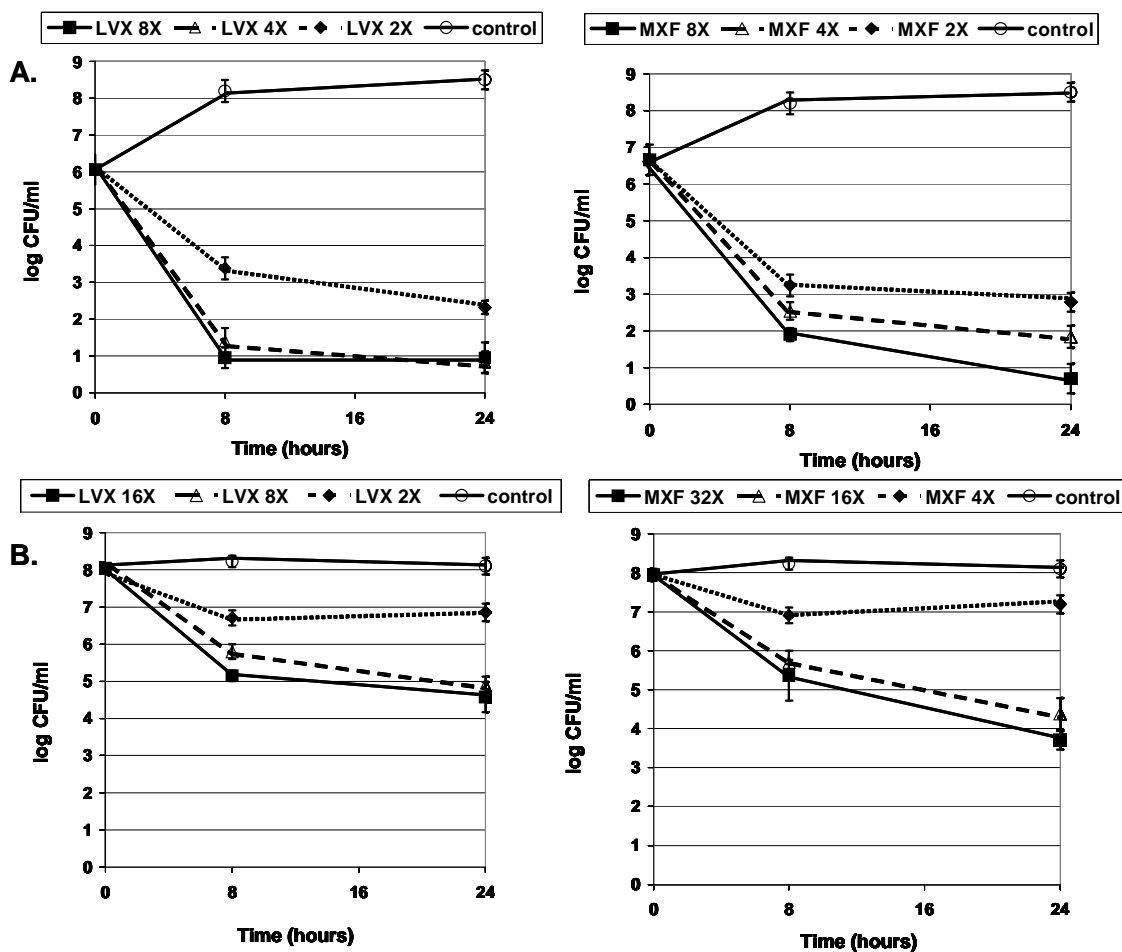


Figura V.14. Curvas de letalidad con las concentraciones más representativas (expresadas en relación xCMI) de levofloxacin (LVX) y moxifloxacin (MXF) en fase exponencial (A) y fase estacionaria (B). Las barras de error representan la desviación estándar.

Los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos obtenidos para las dosis de moxifloxacin, y los equivalentes en humanos, se muestran en comparación con los de levofloxacin a altas dosis (Tabla V.4). Cabe destacar que el parámetro AUC/CMI, considerado como el mejor predictor de la eficacia de las fluoroquinolonas, fue aumentando con el uso de levofloxacin 100, moxifloxacin 40 y moxifloxacin 80 alcanzando valores de 234, 431 y 568, respectivamente.

Antibiótico (mg.kg/h)	RATAS						HUMANOS			
	TCF					Suero		Suero		
	C _{max} (mg/L)	^a Valle (mg/L)	AUC (µg.h/ml)	AUC/MIC	C _{max} /MIC	T _{>MIC} (%)	C _{max} (mg/L)	AUC (µg.h/ml)	C _{max} (mg/L)	AUC (µg.h/ml)
Levofloxacino (100 / 24)	12.2	1.1	117.36	234.72	24.4	100	38.7	106	12-15	90-120
Moxifloxacino (40/24)	4.2	0.1	51.7	431.3	34.7	100	16	48	3-4.5	30-48
Moxifloxacino (80/24)	6,9	0,6	68,2	568,7	57,7	100	23,4	72	4-5,6	42-78

Tabla V.4. Principales parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de levofloxacino y moxifloxacino en los animales, y sus equivalencias con las dosis en humanos de 750-1000mg/d de levofloxacino, y de 400mg/d y 800mg/d de moxifloxacino. ^a Las concentraciones Valle fueron determinadas el día 4 de tratamiento.

Los resultados de la eficacia *in vivo* de ambas fluoroquinolonas, en base a los descensos en los recuentos bacterianos del líquido de las cajas se representan en la Figura V.15. El dato más destacable fue que la eficacia de moxifloxacino, a ambas dosis, no superó la de levofloxacino a pesar de sus parámetros AUC/CMI claramente superiores. En cuanto a los estudios de resistencia, no se detectaron cepas resistentes al final del tratamiento en ninguno de los grupos terapéuticos. En los grupos de tratamiento con moxifloxacino no se hizo un estudio específico de pequeñas variaciones de la CMI respecto de la cepa inicial dentro del rango de sensibilidad.

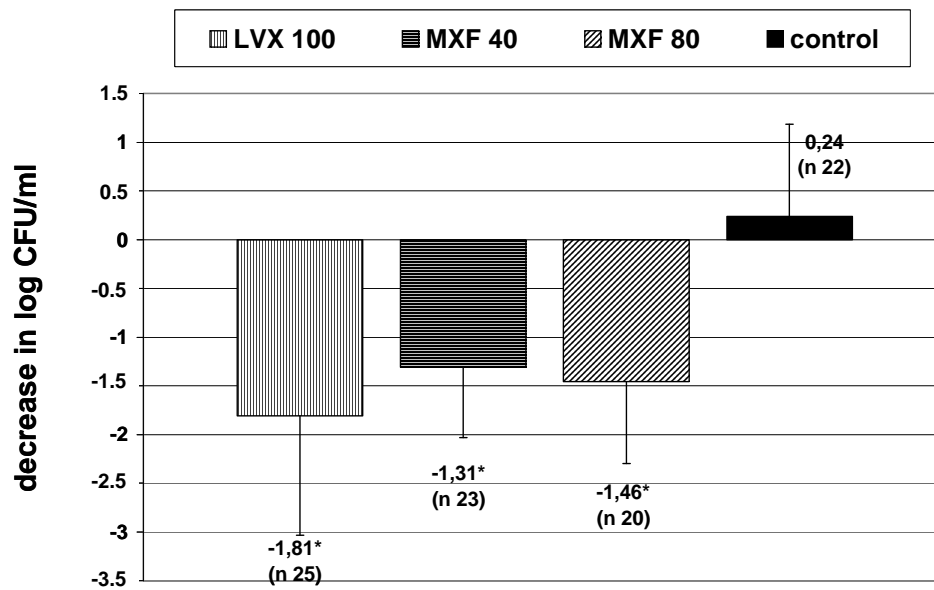


Figura V.15. Descensos de los recuentos bacterianos (media de log UFC/ml \pm desviación estándar) del líquido de las cajas al final del tratamiento para cada grupo terapéutico (LVX, levofloxacino; MXF, moxifloxacino). * $P < 0.05$ vs controles

ANEXO

Artículo 3. O. Murillo, ME. Pachón, G. Euba, R. Verdaguer, F. Tubau, C. Cabellos, J. Cabo, F. Gudiol, J. Ariza. *“High doses of levofloxacin vs moxifloxacin against staphylococcal experimental foreign-body infection: the effect of higher MIC-related pharmacokinetic parameters on efficacy.”* Journal of Infection 2009; 58:220-226.



High doses of levofloxacin vs moxifloxacin against staphylococcal experimental foreign-body infection: The effect of higher MIC-related pharmacokinetic parameters on efficacy

Oscar Murillo ^{a,*}, M. Eugenia Pachón ^a, Gorane Euba ^a, Ricard Verdaguer ^c, Fe Tubau ^c, Carmen Cabellos ^a, Javier Cabo ^b, Francesc Gudiol ^a, Javier Ariza ^a

^a Laboratory of Experimental Infection, Infectious Diseases Service, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, Feixa Llarga s/n, L'Hospitalet de Llobregat, 08907 Barcelona, Spain

^b Orthopaedic Surgery Department, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, Feixa Llarga s/n, 08907 Barcelona, Spain

^c Microbiology Department, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, Feixa Llarga s/n, 08907 Barcelona, Spain

Accepted 15 January 2009

Available online 12 February 2009

KEYWORDS

Device infection;
Fluoroquinolones;
S. aureus;
Animal models

Summary Objectives: Since levofloxacin at high doses was the best therapy in staphylococcal tissue-cage model of foreign-body infection, we hypothesized that moxifloxacin with higher ratio of area under the concentration–time curve to the MIC (AUC/MIC) would provide better results. **Methods:** MICs, MBCs, MPCs (mutant prevention concentration) and 24 h kill-curves were determined in the log and stationary phases. Using the aforementioned model, we tested the efficacy of levofloxacin 100 mg/kg/d, moxifloxacin 40 mg/kg/d and moxifloxacin 80 mg/kg/d; they were equivalent to human levels for 1000 mg/d, 400 mg/d and 800 mg/d, respectively. We screened for the appearance of resistant strains.

Results: MICs and MBCs in logarithmic and stationary phases and MPCs of levofloxacin were 0.5, 1 and 4, 0.8 µg/ml, respectively, and those of moxifloxacin 0.12, 0.25 and 2, 0.25 µg/ml. AUC/MIC were 234 (levofloxacin), 431 (moxifloxacin 40) and 568 (moxifloxacin 80). Bacterial counts decreases in tissue-cage fluids (means of log CFU/ml) were –1.81 ($n = 25$), –1.31 (23), and –1.46 (20), respectively; for controls it was 0.24 (22). All groups were better than controls ($p < 0.05$); no differences between them existed.

Conclusions: Moxifloxacin with higher AUC/MIC ratio did not improve the efficacy of high doses of levofloxacin.

© 2009 The British Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author. Tel.: +34 93 260 76 25; fax: +34 93 260 76 37.

E-mail address: 32186omr@comb.es (O. Murillo).

Introduction

The role of fluoroquinolones in the treatment of staphylococcal foreign-body infections is mainly referred to classical quinolones (ciprofloxacin and ofloxacin) in combination with rifampin.^{1–4} Newer fluoroquinolones, such as levofloxacin, have improved the activity against gram-positive microorganisms including good in vitro activity against non-growing bacteria. The latter activity has been related to higher in vivo efficacy against staphylococcal foreign-body infections when bacteria included in biofilm are in a dormant or non-growing state and are tolerant to antibiotics.^{5–9} On the basis of previous experience, these newer quinolones are being used in clinical practice, despite the lack of clinical trials.¹⁰

The rat tissue-cage model of foreign-body infection reasonably mimics human device infections; this model has been used to report relevant information in recent years.^{11–16} It includes bacterial populations attached to cover-slips forming a biofilm and others directly detached from them in the tissue-cage fluid. Both populations are highly resistant to antibiotics,¹⁵ and the activity of antibiotics diminishes in parallel to both bacterial populations.¹¹ We previously used this model to show the good efficacy of high doses of levofloxacin against device infection by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*.¹⁶ We were surprised by the extent to which the increase in AUC/MIC ratio improved the efficacy of levofloxacin, which was the best antistaphylococcal therapy in this model. Therefore, we hypothesized that moxifloxacin, which exhibits higher in vitro antistaphylococcal activity and has more favourable AUC/MIC ratio than levofloxacin, might improve the in vivo efficacy in this model.

The aim of the present study was to test the in vitro and in vivo activities of conventional and high doses of moxifloxacin and to compare them with the activity of high doses of levofloxacin in a rat model of foreign-body infection by methicillin-susceptible *S. aureus*.

Materials and methods

Microorganism and antimicrobial agents

A methicillin-susceptible *S. aureus* ATCC 29213 was used for the in vitro and in vivo experiments.

The antimicrobial agents were kindly provided by their respective laboratories: levofloxacin (Sanofi-Aventis, Madrid, Spain) and moxifloxacin (Bayer, Madrid, Spain). The purified powder of both drugs was resuspended according to laboratory recommendations for in vitro and in vivo uses.

Determination of MICs, MBCs and MPCs

The MICs and MBCs were determined in the log-phase, following the standard recommendations.¹⁷ A macrodilution method was used with Mueller–Hinton broth (MHB) and an inoculum of 10^5 – 10^6 cfu/ml. The MIC was defined as the minimal concentration of antibiotic that was able to inhibit macroscopic bacterial growth. The MBC was the minimal concentration that killed 99.9% of original inoculum.

The MBCs were also determined in the stationary phase using previously described methodology.^{6,16} In brief, a macrodilution method with a high inoculum of 10^8 cfu/ml and a nutrient-restricted medium (phosphate buffered saline + 1% glucose + 4% MHB) was used. Both conditions have been reported as necessary for bacteria to express in vitro tolerance to antibiotics.⁸ Bacteria were grown for 24 h in MHB, then they were centrifuged (at 2000 g for 10 min) and resuspended in such restricted medium; thus ensuring that bacteria remained stable for up to 24 h under these conditions. The MBCs were defined as above.

The mutant prevention concentrations (MPCs) were determined as previously reported using high inoculums of *S. aureus* (10^{10} cfu/ml) and agar plates containing several known concentrations of antibiotic.^{18,19} The inoculum of *S. aureus* was grown on MHB for 24 h, then it was centrifuged and resuspended to achieve a high inoculum. The agar plates were inoculated with this inoculum and incubated for 48 h at 37°. The MPC was defined as the minimal concentration of antibiotic preventing any macroscopic growth of bacteria at the end of experiment.

24 h Time–kill curves

In vitro time–kill curves were performed using bacteria in the log-phase according to standard recommendations.²⁰ We used 10 ml of MHB medium, an inoculum of 10^5 – 10^6 cfu/ml and prefixed concentrations of antibiotics ranging from 0.5× to 128× MIC. To avoid carryover antimicrobial agent interference, the sample was placed on the plate in a single streak down the centre, allowed to absorb into the agar until the plate surface appeared dry, and the inoculum was then spread over the plate.

We also performed 24 h kill-curves with bacteria in the stationary phase using previously reported methodology.¹⁶ Briefly, to achieve the final inoculum we proceeded as described above, then bacteria were inoculated to the nutrient-restricted medium (phosphate buffered saline + 1% glucose + 4% MHB) with prefixed concentrations. Due to the tolerance to antibiotics expressed by bacteria in the stationary phase, the drug concentrations tested in these experiments were higher than those in the log-phase. The prefixed antibiotic concentrations for levofloxacin and moxifloxacin were equivalent to peak (24× and 32× MIC, respectively) and trough levels (2× and 4× MIC) achieved in the tissue-cage fluids, and another one between these peak and trough concentrations (8× and 16× MIC).

Preparation of inoculum for in vivo use

Bacteria from overnight culture on 5% blood agar plates were grown for 4–6 h in TSB. They were then centrifuged and resuspended in sterile saline solution adjusted to an optical density of 0.5 McFarland and finally diluted to a concentration of 0.2×10^6 – 2×10^6 cfu/ml.

Animal studies

The animal model was approved by the Ethical Committee for Animal Experiments at the University of Barcelona.

The model was derived from that reported by Lucet et al.¹¹; we standardized this model using the methodology reported in our previous work.¹⁶ We used male Wistar rats weighing 200–220 g at the beginning of experiments; they were given food and water *ad libitum* throughout the study. The rats were anesthetized with (i) an intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg; Parke–Davis, Madrid, Spain) plus xilacyn (20 mg/kg; Bayer, Barcelona, Spain) for the surgical procedure; and (ii) with isoflurane (Abbott, Madrid, Spain) for the remaining procedures to obtain samples of tissue-cage fluids. After the surgery, rats received analgesia with buprenorphine (0.01 mg/kg; Schering Plough, Madrid, Spain). At the end of experiments, animals were sacrificed with an intracardiac injection of thiopental (Braun, Barcelona, Spain).

Two multiperforated Teflon tissue-cages (TCs) containing two cover-slips each were subcutaneously implanted in the flank of the rat. After three weeks, a sample of tissue-cage fluid (TCF) was recovered and screened for sterility; then 0.1 ml of saline solution containing *S. aureus* was inoculated. Three weeks later, a chronic infection was well established and a sample of TCF was again recovered to quantify bacterial counts (designated as day 1). A minimum of 10⁵ cfu/ml was required for the therapeutic experiments. The animals were intraperitoneally treated for seven days; 24 h after the last dose, a sample of TCF was recovered and bacterial counts were quantified (designated as day 8). To avoid carryover, we proceeded as indicated above. The differences in the bacterial counts from TCF between the beginning and the end of treatment were used as criteria of therapeutic efficacy. Once rats had been sacrificed, the cover-slips were aseptically removed and processed as indicated below.

The therapeutic groups were as follow: levofloxacin 100 mg/kg/d, moxifloxacin 40 mg/kg/d, moxifloxacin 80 mg/kg/d and controls. The antibiotic dosage was selected according to pharmacokinetic studies (see below).

Process of TCFs and cover-slips

The samples of TCF (100 µl) were sonicated (150 W × 1 min; Afora, Madrid, Spain) to disrupt bacterial counts. Then 100 µl and their ten-fold dilutions were cultured on TSA with 5% sheep blood plates (for 48 h at 37°) to quantify bacterial counts (as log cfu/ml).

The cover-slips removed were rinsed in 1 ml of PBS and sonicated. Then they were incubated for 20 min at 37° in 1 ml of PBS with trypsin (6 U/ml; Sigma, Madrid, Spain). The final fluid was recovered to screen for the presence of resistant strains.

All these procedures have been reported as being harmless for bacteria.^{11,15}

Pharmacokinetic studies

Previous to therapeutic experiments, the antibiotic dosages were selected according to pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters using the methodology described in our previous work.¹⁶

A single weight-adjusted dose was administered to a group of healthy rats; after, samples of blood and TCF were recovered at several time-points (1, 2, 3, 4, 8, 12 and 24 h). In order to select the more appropriate dosage in

rats, we based on previous data about the relations in drug concentrations between extravascular fluids and serum in our model: 1) the area under the concentration–time curve (AUC) is similar in both the TCF and the serum; and 2) peak concentrations and the time the drug concentration remained above the MIC in TCF tend to be lesser and higher than in serum, respectively.^{21–23} In fact, we mainly adjusted the AUC value for each antibiotic that resulted similar in both animals (either in serum or in TCF) and humans.^{24–28}

Peak and trough levels in TCF were determined on day 4 for each drug to check the equilibrium test concentrations during treatment.

The following parameters were determined: peak concentration (C_{max}), elimination half-life ($t_{1/2}$), elimination rate constant, AUC, the time the drug concentration remained above the MIC ($T_{>MIC}$), the AUC/MIC and C_{max}/MIC .

The levels of antibiotics were determined using a bioassay method.²⁹ The microorganisms used were *Escherichia coli* ATCC 35218 for levofloxacin, and *S. aureus* ATCC 29213 for moxifloxacin.

Screening of resistance

According to the general breakpoint of resistance to fluoroquinolones among *S. aureus*, we used agar plates containing 1 mg/L of levofloxacin or moxifloxacin. Thus, we only checked for the presence of resistant strains but we did not study the slight changes in initial MICs. The TCF samples and processed fluid from cover-slips were cultured in these plates for 48 h at 37°; after, the presence of bacterial growth was screened. Results were qualitatively interpreted as positive (some macroscopic bacterial growth) or negative (no growth).

Statistical analysis

All bacterial counts are presented as log cfu/ml (mean ± standard deviation). Data were found to be normally distributed when applying the Kolmogorov–Smirnov test. Analysis of variance (ANOVA) and Scheffe's correction were used to compare differences between groups in bacterial counts. For all tests, differences were considered statistically significant when p values were <0.05.

Results

Determination of MICs, MBCs and MPCs

The MICs and MBCs in logarithmic and stationary phases and MPCs for each antibiotic are shown in Table 1.

Table 1 MICs (mg/L) and MBCs (mg/L) in the logarithmic and stationary phases, and MPCs (mg/L) for levofloxacin and moxifloxacin.

Antibiotic	MIC	MBC (log-phase)	MBC (stationary phase)	MPC
Levofloxacin	0.5	1	4	0.8
Moxifloxacin	0.12	0.25	2	0.25

Moxifloxacin exhibited lower MIC and MBC values than levofloxacin in both phases. In the log phase, MBCs for moxifloxacin and levofloxacin were at concentration $2\times$ MIC. In the stationary phase, the MBC for moxifloxacin was at concentration $16\times$ MIC, whereas for levofloxacin was at $8\times$ MIC.

In vitro studies

Kill-curves in the log-phase showed bactericidal activity for both quinolones at concentrations $2\times$ MIC (Fig. 1).

Kill-curves showed that in the stationary phase both quinolones had remarkable bactericidal activity against non-growing bacteria. However, higher antibiotic concentrations than those in the log-phase were necessary for both quinolones to reach such activity. Moxifloxacin achieved bactericidal killing at concentrations $16\times$ MIC, whereas levofloxacin reached the same level of killing at $8\times$ MIC. In both cases, these concentrations are achieved in human clinical practice with standard dosages (Fig. 1).

In vivo studies

The main pharmacokinetic parameters and their ratios to the MICs are shown in Table 2.

Moxifloxacin (40 mg/kg/d) had peak levels and AUC values in TCF that were equivalent to human 400 mg/d

doses, whereas higher human doses (i.e. 800 mg/d) were represented by the animal group of moxifloxacin 80 mg/kg/d. Levofloxacin had peak levels and an AUC equivalent to human doses 1000 mg/d.

The analysis of AUC/MIC parameters showed progressively higher ratios for levofloxacin, moxifloxacin 40 and moxifloxacin 80, respectively.

No substantial differences in drug concentrations were noted between healthy and infected rats; the peak and trough concentrations in TCF at day 4 of therapy showed that there was a tendency to accumulate in infected rats, compared to healthy animals (data not shown).

Pharmacokinetic parameters in relation to MPCs for levofloxacin, moxifloxacin 40 and moxifloxacin 80 respectively were as follows: AUC/MPC of 146.7, 206.8 and 272.8; and C_{max} /MPC of 15.2, 16.8 and 27.6.

A total of 55 rats (110 TCs) were used; some tissue cages were lost during the experiment by spontaneous shedding. Finally, therapeutic groups were levofloxacin ($n = 25$ TCs), moxifloxacin 40 ($n = 23$), moxifloxacin 80 ($n = 20$) and controls ($n = 22$).

At the beginning of the treatment, there were no differences between groups in the bacterial counts of TCF. They (means log CFU/ml \pm S.D.) were as follows: 6.64 ± 0.92 (levofloxacin), 6.56 ± 0.92 (moxifloxacin 40), 6.34 ± 0.99 (moxifloxacin 80) and 6.71 ± 0.97 (controls).

At the end of the treatment, all therapeutic groups were better than controls but no differences between them were

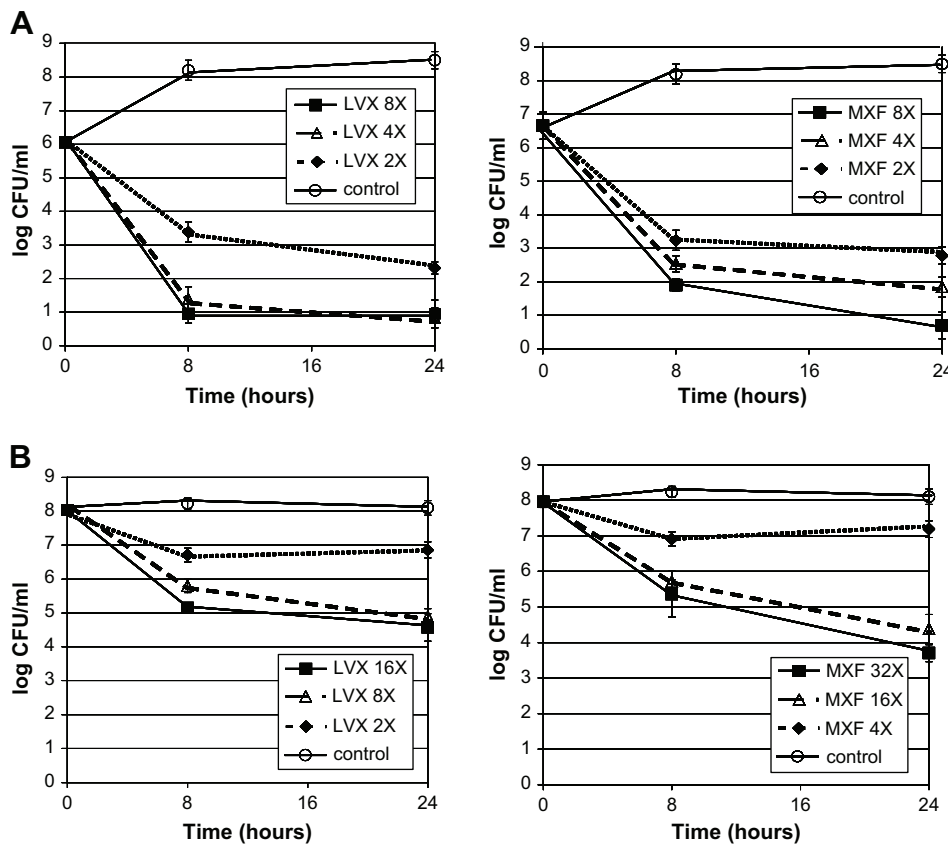


Figure 1 Time kill-curves showing the most representative concentrations (related to \times MIC) of levofloxacin and moxifloxacin in the log (A) and stationary (B) phases. Error bars indicate standard deviations; in some cases they are smaller than the symbols to be appreciate. Abbreviations: LVX, levofloxacin; and MXF, moxifloxacin.

Table 2 Main pharmacokinetic parameters and their ratios to the MICs.

Antibiotic (mg kg/h)	Rats							Human ^a					
	TCF							Serum			Serum		
	C _{max} (mg/L)	^b Trough (mg/L)	AUC (µg h/ml)	t _{1/2} (h)	AUC/MIC	C _{max} /MIC	T _{>MIC} (%)	C _{max} (mg/L)	AUC (µg h/ml)	t _{1/2} (h)	C _{max} (mg/L)	AUC (µg h/ml)	t _{1/2} (h)
Levofloxacin (100/24)	12.2	1.1	117.4	5.5	234.7	24.4	100	38.7	106	2.1	12–15	90–120	7.45
Moxifloxacin (40/24)	4.2	0.1	51.7	4.4	431.3	34.7	100	16	48	1.5	3–4.5	30–48	9.3
Moxifloxacin (80/24)	6.9	0.6	68.2	8.2	568.7	57.7	100	23.4	72	2.3	4–5.6	42–78	12.3

^a The antibiotic doses in humans that lead to these pharmacokinetic parameters are as follows: levofloxacin 1000 mg/d²⁵ (equivalent to levofloxacin 100 in rats), moxifloxacin 400 mg/d²⁶ (equivalent to moxifloxacin 40 in rats) and moxifloxacin 800 mg/d²⁸ (equivalent to moxifloxacin 80 in rats).

^b Trough concentrations were determined on day 4 of therapy.

noted. These bacterial counts (means log CFU/ml ± S.D.) were as follows: 4.83 ± 1 (levofloxacin), 5.25 ± 1 (moxifloxacin 40), 4.88 ± 0.86 (moxifloxacin 80) and 6.95 ± 1.1 (controls).

A comparison of decreases in bacterial counts between groups after treatment is represented in Fig. 2.

Both moxifloxacin groups exhibited higher AUC/MIC parameters than levofloxacin; however, these parameters did not correlate with higher efficacy. For all therapeutic groups, the peak levels in TCF were higher than stationary phase MBC values.

There was no emergence of levofloxacin- or moxifloxacin-resistant strains (MICs ≥ 1 µg/ml) in either group in the TCF or in the cover-slips. Slight changes in initial MIC values for moxifloxacin were not studied.

Discussion

Fluoroquinolones are considered concentration-dependent antibiotics and the AUC/MIC ratio is the best predictor of

efficacy; the higher the ratio, the greater the efficacy.^{21,30,31} In the present study, we used a rat model of foreign body infection by *S. aureus* to test the in vitro and in vivo efficacy of conventional and high doses of moxifloxacin, both exhibiting higher AUC/MIC ratios than levofloxacin, and to compare them to the efficacy of high doses of levofloxacin.

Several in vitro studies have reported the high antistaphylococcal activity of moxifloxacin, although they usually tested bacteria in the log-phase.^{32–34} To our knowledge, this study is the first to report how moxifloxacin also has bactericidal activity against bacteria in the stationary phase of growth. For equivalent MIC-related concentrations (i.e. 2 × MIC), the in vitro bactericidal activity of moxifloxacin and levofloxacin by kill-curves was similar.

Thus, the potential advantages of moxifloxacin in terms of antistaphylococcal efficacy are related to its greater AUC/MIC ratio, which are clearly higher than the minimal AUC/MIC ratio of 125 required for fluoroquinolones to be clinically efficacious.³⁵ Since this ratio was specifically proved for ciprofloxacin and mainly against gram-negative bacteria, Firsov et al. used in vitro pharmacodynamic studies to report how different AUC/MIC ratios for each fluoroquinolone represent the same antistaphylococcal activity as that reached by ciprofloxacin.³⁴ Interestingly, they reported that these ratios were less than 125 for levofloxacin and moxifloxacin and were achieved by clinical doses of 750 mg/d levofloxacin but not by 500 mg/d, whereas conventional doses of moxifloxacin (400 mg/d) assured higher values (AUC/MIC 200) than those of levofloxacin.

Animal models of infection are considered appropriate for testing the relationships between the pharmacodynamic parameters of antibiotics and their in vivo efficacy.^{21,36} In our rat tissue-cage model of foreign-body infection, we previously reported the impact of increasing AUC/MIC ratio on the antistaphylococcal efficacy of levofloxacin. These results supported the use of high doses of levofloxacin (750–1000 mg/d) for the treatment of orthopaedic prosthetic infection, as recently recommendations.^{10,16} In the present study, moxifloxacin 40 (AUC/MIC: 431) and

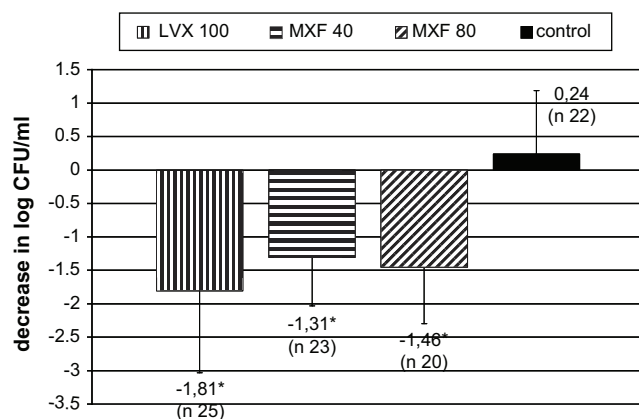


Figure 2 Comparison between groups of decreases in bacterial counts (means of log CFU/ml) at the end of therapy. Error bars indicate standard deviations. Abbreviations: LVX, levofloxacin; and MXF, moxifloxacin. **p* < 0.05 vs control.

moxifloxacin 80 (AUC/MIC: 568) had much greater AUC/MIC ratios than high doses of levofloxacin (AUC/MIC: 234); however, this was not associated with an increase in the maximal efficacy reached by levofloxacin. Although these results could seem surprising, indeed they are not so unexpected when revising previous reports. Really, an optimized bactericidal concentration (OBC: optimum bactericidal concentration) has been described for quinolones, beyond which higher concentrations of antibiotic do not reach higher efficacy.^{37–40} In the case of moxifloxacin and levofloxacin, the effect of increasing AUC/MIC ratios on in vitro efficacy against *S. aureus* showed similar efficacies for both quinolones with AUC/MIC > 100 by three of four methods studied.⁴¹

Other in vitro evidence of the maximal efficacy of quinolones was shown in recent studies on intracellular killing of *S. aureus*,^{42,43} although these results could be related to the saturable transport of antibiotics into the cells rather than to the saturable quinolone activity.

The results comparing high doses of levofloxacin and moxifloxacin should also be interpreted on the basis of protection against the emergence of resistance. We did not detect any resistant strain in the therapeutic groups; thus, our results also showed how both quinolones helped protect against the emergence of resistance after 7-days of therapy. We screened for the appearance of resistant strains by expressing MIC > 1 mg/L for levofloxacin or moxifloxacin (an increasing in resistant strain MIC of 2× and 8× respectively) and thus, we did not aim to study the appearance of slight changes in MIC for moxifloxacin. However, previous studies seem to support a close safety profile for both quinolones at pharmacodynamic parameters similar to ours. First, a C_{max}/MIC ratio of fluoroquinolones above 8–10 is related to clinical protection against the emergence of resistant *S. aureus* when using fluoroquinolones alone⁴⁴; in our study both levofloxacin and moxifloxacin had values over double this ratio. Second, more recent in vitro pharmacodynamic studies testing the mutant selection window (MSW) hypothesis reported that when the antibiotic concentration was inside the MIC to MPC range (the named MSW) the emergence of resistant strains was maximal, in contrast, when concentrations were above the MSW no resistance was noted.⁴⁵ Studies that evaluated the safety of levofloxacin and moxifloxacin against *S. aureus* reported that a minimal AUC/MIC ratio of 200 was needed to guarantee no changes in MIC. The MSW hypothesis was recently demonstrated in vivo in a tissue-cage infection model by *S. aureus* in rabbits, supporting previous in vitro results by levofloxacin.⁴⁶ In this study, the authors reported a correlation of MIC- and MPC-related pharmacokinetic parameters with the appearance of resistance. When the C_{max}/MIC , AUC/MIC, C_{max}/MPC and AUC/MPC ratios were greater than 8, 150, 1.2 and 25, respectively, no changes in MICs were noticed. In agreement with these results, we found quite low MPC values for levofloxacin and moxifloxacin; the pharmacodynamic parameters for high doses of levofloxacin and both doses of moxifloxacin referring to MPCs in our study should guarantee a good protective profile against the emergence of resistant strains.

In conclusion, moxifloxacin with higher AUC/MIC ratios did not improve the efficacy of high doses of levofloxacin in

this difficult-to-treat infection. High doses of levofloxacin and moxifloxacin both seem to offer safety protection against the emergence of resistant strains.

Acknowledgments

We thank C. Masuet, from Hospital Universitari de Bellvitge, for her assistance in the statistical analysis. This work was supported by a research grant from Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III (FIS 04/005) and grants from the Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI C03/14; REIPI RD06/0008). O. M. was supported by a grant from the REIPI. The study was performed without any financial support from pharmaceutical laboratories.

Presented in part: 47th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago 17–20 September 2007 (abstract B-822).

References

1. Widmer AF, Gaechter A, Ochsner PE, Zimmerli W. Antimicrobial treatment of orthopedic implant-related infections with rifampin combinations. *Clin Infect Dis* 1992;14:1251–3.
2. Drancourt M, Stein A, Argenson JN, Zannier A, Curvale G, Raoult D. Oral rifampin plus ofloxacin for treatment of *Staphylococcus*-infected orthopedic implants. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:1214–8.
3. Drancourt M, Stein A, Argenson JN, Roiron R, Groulier P, Raoult D. Oral treatment of *Staphylococcus* spp. infected orthopaedic implants with fusidic acid or ofloxacin in combination with rifampin. *J Antimicrob Chemother* 1997;39:235–40.
4. Zimmerli W, Widmer AF, Blatter M, Frei R, Ochsner PE. Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections. *JAMA* 1998;279:1537–41.
5. Widmer AF, Frei R, Rajacic Z, Zimmerli W. Correlation between in vivo and in vitro efficacy of antimicrobial agents against foreign body infections. *J Infect Dis* 1990;162:96–102.
6. Zimmerli W, Frei R, Widmer AF, Rajacic Z. Microbiological test to predict treatment outcome in experimental device-related infections due to *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1994;33:959–67.
7. Blaser J, Vergeres P, Widmer AF, Zimmerli W. In vivo verification of in vitro model of antibiotic treatment of device-related infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1134–9.
8. Costerton JW, Stewart P, Greenberg EP. Bacterial biofilm: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:1318–22.
9. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001;358:135–8.
10. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med* 2004;351:1645–54.
11. Lucet JC, Herrmann M, Rohner P, Auckenthaler R, Waldvogel FA, Lew DP. Treatment of experimental foreign body infection caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:2312–7.
12. Chuard C, Herrmann M, Vaudaux P, Waldvogel FA, Lew DP. Successful therapy of experimental chronic foreign-body infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antimicrobial combinations. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:2611–6.
13. Vaudaux P, Francois P, Bisognano C, Schrenzel J, Lew DP. Comparison of levofloxacin, alatrofloxacin and vancomycin for prophylaxis and treatment of experimental foreign-body-associated

- infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1503–9.
14. Murillo O, Domenech A, Euba G, Verdager R, Tubau F, Cabo J, et al. Efficacy of linezolid alone and in combination with rifampin in staphylococcal experimental foreign-body infection. *J Infection* 2008;57:229–35. doi:10.1016/j.jinf.2008.07.003.
 15. Chuard C, Lucet JC, Rohner P, Herrmann M, Auckenthaler R, Waldvogel FA, et al. Resistance of *Staphylococcus aureus* recovered from infected foreign body in vivo to killing by antimicrobials. *J Infect Dis* 1991;163:1369–73.
 16. Murillo O, Domenech A, Garcia A, Tubau F, Cabellos C, Gudiol F, et al. Efficacy of high doses of levofloxacin in experimental foreign-body infection by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:4011–7.
 17. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. Approved Standard M7-A6. 6th ed. Wayne, PA, USA: CLSI; 2005.
 18. Zhao X, Drlica K. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants: a general strategy derived from fluoroquinolone studies. *Clin Infect Dis* 2001;33:S147–56.
 19. Drlica K, Zhao X. Mutant selection window hypothesis updated. *Clin Infect Dis* 2007;44:681–8.
 20. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents M26-A*. Villanova, PA, USA: NCCLS; 1999.
 21. Craig W. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* 1998;26:1–12.
 22. Ryan M, Hodges B, Spencer GR, Harding SM. Simultaneous comparison of three methods for assessing ceftazidime penetration into extravascular fluid. *Antimicrob Agents Chemother* 1982;22:995–8.
 23. Trampuz A, Wenk M, Rajacic Z, Zimmerli W. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of levofloxacin against *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in human skin blister fluid. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1352–5.
 24. Chow AT, Fowler C, Williams R, Morgan N, Kaminski S, Natarajan J. Safety and pharmacokinetics of multiple 750-milligram doses of intravenous levofloxacin in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2122–5.
 25. Conte Jr JE, Golden JA, McIver M, Zurlinden E. Intrapulmonary pharmacokinetics and pharmacodynamics of high-dose levofloxacin in healthy volunteer subjects. *Int J Antimicrob Agents* 2006;28:114–21.
 26. Sullivan JT, Woodruff M, Lettieri J, Agarwal V, Krol GJ, Lesse PT, et al. Pharmacokinetics of a once-daily oral dose of moxifloxacin (Bay 12-8039), a new enantiomerically pure 8-methoxy quinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2793–7.
 27. Krasemann C, Meyer J, Tillotson G. Evaluation of the clinical microbiology profile of moxifloxacin. *Clin Infect Dis* 2001;32: S51–63.
 28. Stass H, Dalhoff A, Kubitzka D, Schuhly U. Pharmacokinetics, safety, and tolerability of ascending single doses of moxifloxacin, a new 8-methoxy quinolone, administered to healthy subjects. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2060–5.
 29. Chapin-Robertson K, Edberg SC. Measurements of antibiotics in human body fluids: techniques and significance. In: Lorian V, editor. *Antibiotics in laboratory medicine*. New York: Williams and Wilkins; 1991. p. 295–366.
 30. Craig W. Does the dose matter? *Clin Infect Dis* 2001;33:S233–7.
 31. Van Bambeke F, Michot JM, Van Eldere J, Tulkens PM. Quinolones in 2005: an update. *Clin Microbiol Infect* 2005;11: 256–80.
 32. Bauernfeind A. Comparison of the antibacterial activities of the quinolones BAY 12-8039, gatifloxacin (AM 1155), trovafloxacin, clinafloxacin, levofloxacin and ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother* 1997;40:639–51.
 33. Lister PD. Pharmacodynamics of moxifloxacin and levofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in an in vitro pharmacodynamic model. *Clin Infect Dis* 2001;32: S33–8.
 34. Firsov A, Lubenko I, Vostrov S, Portnoy Y, Zinner S. Antistaphylococcal effect related to the area under the curve/MIC ratio in an in vitro dynamic model: predicted breakpoints versus clinically achievable values for seven fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:2642–7.
 35. Forrest A, Nix D, Ballow C, Goss T, Birmingham M, Schentag J. Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:1073–81.
 36. Andes D, Craig W. Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review. *Int J Antimicrob Agents* 2002;19:261–8.
 37. Piddock L. New quinolones and gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:163–9.
 38. Lewin CS, Morrissey I, Smith JT. The mode of action of quinolones: the paradox in activity of low and high concentrations and activity in the anaerobic environment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991;10:240–8.
 39. Crumplin GC, Smith JT. Nalidixic acid: an antibacterial paradox. *Antimicrob Agents Chemother* 1975;8:251–61.
 40. Hyatt JM, Nix D, Schentag J. Pharmacokinetic and pharmacodynamic activities of ciprofloxacin against strains of *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* for which MICs are similar. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:2730–7.
 41. Firsov A, Zinner S, Vostrov S, Portnoy Y, Lubenko I. AUC/MIC relationships to different endpoints of the antimicrobial effect: multiple-dose in vitro simulations with moxifloxacin and levofloxacin. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:533–9.
 42. Barcia-Macay M, Seral C, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens P, Van Bambeke F. Pharmacodynamic evaluation of the intracellular activities of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a model of THP-1 macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:841–51.
 43. Nguyen HA, Grellet J, Dubois V, Saux MC, Quentin C. Factors compromising the activity of moxifloxacin against intracellular *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2007;59: 755–8.
 44. Thomas J, Forrest A, Bhavnani S, Hyatt J, Cheng A, Ballow C, et al. Pharmacodynamic evaluation of factors associated with the development of bacterial resistance in acutely ill patients during therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:521–7.
 45. Firsov A, Vostrov S, Lubenko I, Drlica K, Portnoy Y, Zinner S. In vitro pharmacodynamic evaluation of the mutant selection window hypothesis using four fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47: 1604–13.
 46. Cui J, Liu Y, Wang R, Tong W, Drlica K, Zhao X. The mutant selection window in rabbits infected with *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 2006;194:1601–8.

OBJETIVO CUARTO.**Estudiar la eficacia de la combinación levofloxacino-rifampicina en la infección de cuerpo extraño por *S. aureus* sensible a meticilina**

Artículo 4. O. Murillo, ME. Pachón, G. Euba, R. Verdaguer, F. Tubau, J. Cabo, C. Cabellos, F. Gudiol, J. Ariza. "Antagonistic effect of rifampin on the efficacy of levofloxacin at high doses in staphylococcal experimental foreign-body infection." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008; 52:3681-3686.

Los resultados obtenidos son la base principal del Artículo 4. Se estudió la eficacia comparativa de las dos dosificaciones de levofloxacino (50 mg/kg/d y 100 mg/kg/d) en solitario y en combinación, cada una de ellas, con rifampicina.

Los resultados *in vitro* mediante curvas de letalidad mostraron nuevamente la actividad bactericida de levofloxacino en ambas fases y observamos que rifampicina produjo un claro efecto antagónico sobre levofloxacino en fase exponencial expresado a partir de una concentración mayor o igual a 2xCMI de levofloxacino (su CMB). El efecto de la combinación en fase estacionaria fue indiferente, aunque a partir de concentraciones de levofloxacino mayores que su CMB (8xCMI) se observó una cierta tendencia al antagonismo. Debido a la falta de evidencia previa sobre la acción final de esta combinación en fase estacionaria, estudiamos también *in vitro* la asociación de moxifloxacino y rifampicina y obtuvimos unos resultados similares en ambas fases de crecimiento. Los resultados más representativos de las curvas de letalidad de levofloxacino-rifampicina se muestran en la Figura V.16 en las que destaca el descenso de actividad ($> 1 \log \text{ cfu/ml}$) en fase estacionaria de la combinación frente a levofloxacino en solitario a una concentración de 12 $\mu\text{g/ml}$ (24xCMI).

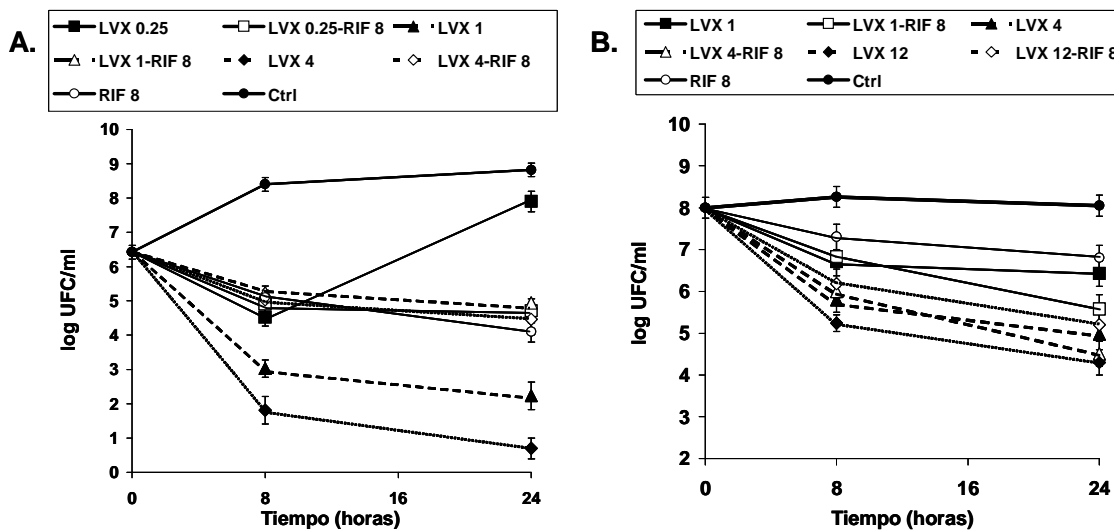


Figura V.16. Curvas de letalidad de levofloxacin (LVX) solo y en combinación con rifampicina (RIF) en fase exponencial (A) con concentraciones subinhibitorias y clínicamente alcanzables ($\mu\text{g/ml}$) y en fase estacionaria (B) con concentraciones pico y valle en el líquido de las cajas. El efecto de antagonismo en la combinación se observa en fase exponencial con las concentraciones LVX 1 y LVX 4, mientras que en fase estacionaria se aprecia con la concentración LVX 12.

Los estudios *in vivo* en el modelo animal incluyeron la doble evaluación de la eficacia después de un tratamiento de 7 o de 14 días y sus resultados se muestran en la Figura V.17. Levofloxacin a altas dosis fue la terapia más eficaz (decremento de bacterias en $\log \text{cfu/ml} = -2.08$) después de 7 días de tratamiento siendo significativamente mejor que levofloxacin 50 (decremento = -1.24) y que las combinaciones de rifampicina con ambas dosis de levofloxacin (levofloxacin 50-rifampicina = -1.51 ; levofloxacin 100-rifampicina = -1.55). Para analizar con más profundidad el antagonismo *in vivo* de rifampicina sobre levofloxacin 100, se estudió la eficacia de ambos grupos después de un tratamiento de 14 días. Levofloxacin 100 fue nuevamente más activo que su combinación con rifampicina y su eficacia alcanzó

significación estadística sobre la población de bacterias adherentes (Figura V.18). Determinamos específicamente los niveles de levofloxacino al administrarse en combinación con rifampicina y comprobamos que no disminuían de forma significativa respecto de los alcanzados con la quinolona en solitario. El estudio de resistencias demostró la protección mutua entre levofloxacino con ambas dosificaciones y rifampicina.

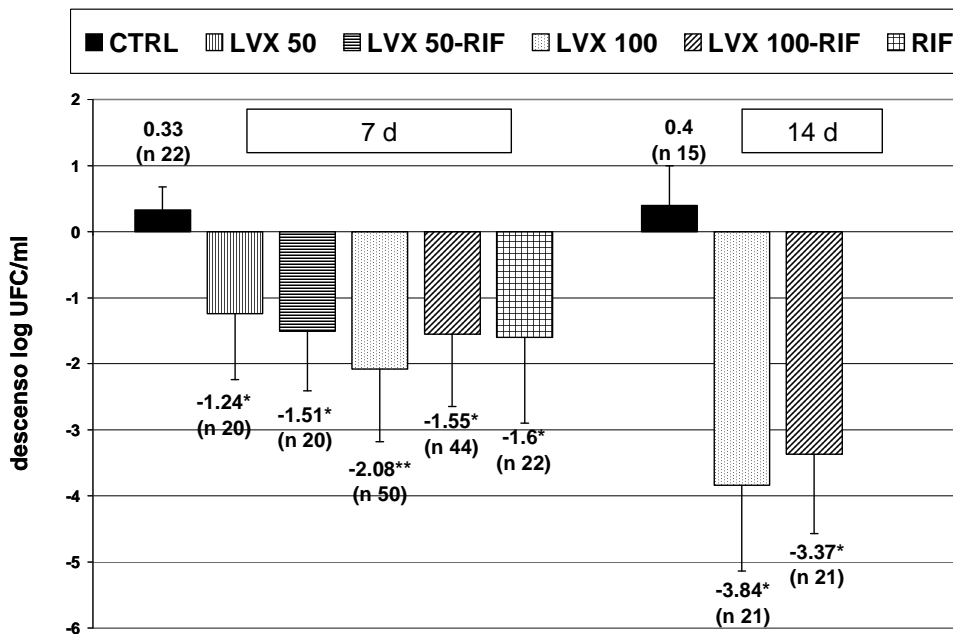


Figura V.17. Comparación entre grupos de los descensos de recuentos bacterianos en el líquido de las cajas (media de log UCF/ml \pm desviación estándar) al final del tratamiento de 7 días (7d) y 14 días (14d). Entre paréntesis se muestra el número de muestras de líquido de las cajas que resulta mayor para levofloxacino 100 y levofloxacino 100-rifampicina porque algunos animales fueron tratados hasta los 14 días. * $P < 0.05$ vs controles; ** $P < 0.05$ vs LVX50-RIF y LVX100-RIF, y $P < 0.03$ vs LVX 50 y controles.

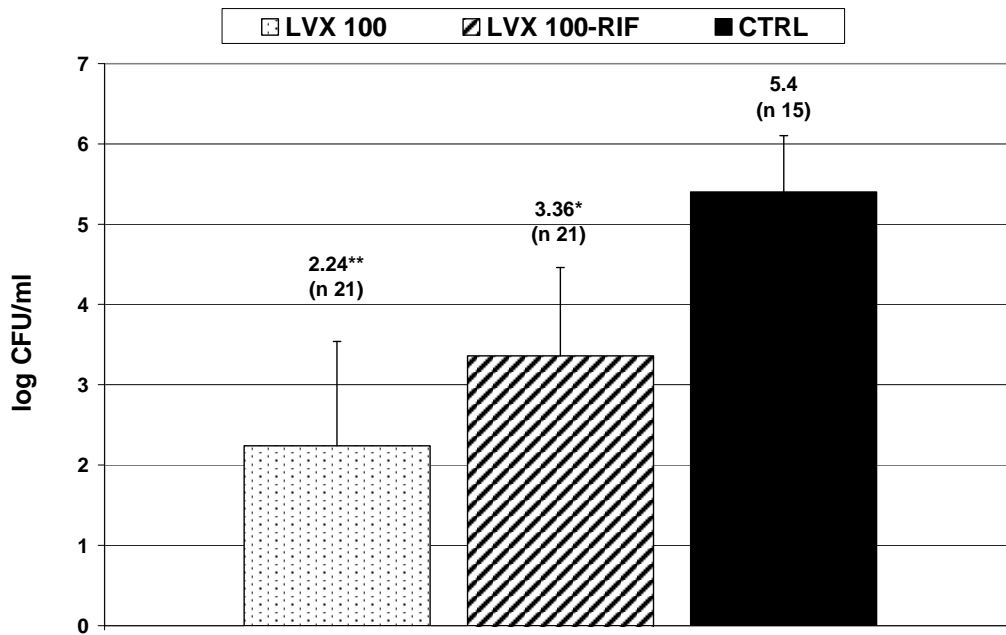


Figura V.18. Recuentos cuantitativos de las bacterias adheridas a las piezas de metacrilato (media de log UCF/ml \pm desviación estándar) al final del tratamiento de 14 días. Entre paréntesis se muestra el número de muestras. * $P < 0.05$ vs controles; ** $P < 0.05$ vs LVX100-RIF y controles.

ANEXO

Artículo 4. O. Murillo, ME. Pachón, G. Euba, R. Verdaguer, F. Tubau, J. Cabo, C. Cabellos, F. Gudiol, J. Ariza. “*Antagonistic effect of rifampin on the efficacy of levofloxacin at high doses in staphylococcal experimental foreign-body infection.*” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008; 52:3681-3686.

Antagonistic Effect of Rifampin on the Efficacy of High-Dose Levofloxacin in Staphylococcal Experimental Foreign-Body Infection[∇]

O. Murillo,^{1*} M. E. Pachón,¹ G. Euba,¹ R. Verdaguer,² F. Tubau,²
C. Cabellos,¹ J. Cabo,³ F. Gudiol,¹ and J. Ariza¹

Laboratory of Experimental Infection, Infectious Diseases Service,¹ Microbiology Department,² and Orthopaedic Surgery Department,³
IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, Feixa Llarga s/n, Barcelona 08907, Spain

Received 7 April 2008/Returned for modification 22 June 2008/Accepted 24 July 2008

Since levofloxacin at high doses was more active than levofloxacin at conventional doses and was the best therapy alone in a rat model of staphylococcal foreign-body infection, in this study we tested how these differences affect the activities of their respective combinations with rifampin in vitro and in vivo. In vitro studies were performed in the log and stationary phases. By using this model, rifampin at 25 mg/kg of body weight/12 h, levofloxacin at 100 mg/kg/day, levofloxacin at 100 mg/kg/day plus rifampin, levofloxacin at 50 mg/kg/day, levofloxacin at 50 mg/kg/day plus rifampin, or a control treatment was administered for 7 days; and therapy with for levofloxacin at 100 mg/kg/day alone and rifampin alone was prolonged to 14 days. We screened for the appearance of resistant strains. Killing curves in the log phase showed a clear antagonism with levofloxacin at concentrations $\geq 2 \times$ MIC and rifampin and tended to occur in the stationary phase. At the end of 7 days of therapy, levofloxacin at 100 mg/kg/day was the best treatment and decreased the bacterial counts from tissue cage fluid ($P < 0.05$ compared with the results for groups except those receiving rifampin alone). At the end of 14 days of therapy with levofloxacin at 100 mg/kg/day, levofloxacin at 100 mg/kg/day plus rifampin, and the control treatment, the bacterial counts on the coverslips were 2.24 ($P < 0.05$ compared with the results with the combined therapy), 3.36, and 5.4 log CFU/ml, respectively. No rifampin or levofloxacin resistance was detected in any group except that receiving rifampin alone. In conclusion, high-dose levofloxacin was the best treatment and no resistant strains appeared; the addition of rifampin showed an antagonistic effect. The efficacy of the rifampin-levofloxacin combination is not significantly improved by the dosage of levofloxacin.

Orthopedic prosthetic infections are difficult to treat because of the presence of bacterial biofilms. The definitive therapy for such infections requires a combination of surgical and medical approaches and the use of selected antibiotics active against the microorganisms involved (11, 40, 48).

On the basis of previous experimental and clinical studies, rifampin plays a main role in the treatment of staphylococcal foreign-body infections (4, 45, 47, 49), while fluoroquinolones are considered the best drugs for use in combination with rifampin (14, 15, 46). Recent work recommended the use of a combination of high doses of levofloxacin (750 to 1,000 mg/day) plus rifampin for the treatment of staphylococcal prosthetic infections (48), even though the information available from this setting is limited (3, 34, 39).

The rat model of staphylococcal tissue cage infection is a well-standardized model of chronic foreign-body infection that has provided relevant information in this regard (8, 9, 32, 44). Using this model, we previously reported that high-dose levofloxacin (equivalent to 750 to 1,000 mg/day) was more active than the conventional levofloxacin dose (500 mg/day) and that it was the best therapy for use alone in comparison to therapy with other antistaphylococcal drugs (34). The aim of the present study was to test the extent to which these differences in activity between conventional and high doses of levofloxacin

affect the efficacies of their respective combinations with rifampin in vitro and in vivo.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism and antimicrobial agents. Methicillin-susceptible strain *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 was used for all experiments.

The antimicrobial agents (levofloxacin and rifampin) were kindly provided by Sanofi-Aventis (Madrid, Spain).

In vitro studies. (i) **Determination of MICs and MBCs.** The MICs and the minimal bactericidal concentrations (MBCs) were determined in the log phase by the macrodilution method and by the methodology recommended previously (10). The MICs were defined as the minimal concentration of antibiotic that was able to inhibit macroscopic growth. The MBCs were defined as the minimal concentration of antibiotic that was able to kill 99.9% of the bacteria from the initial inoculum.

The MBCs were also determined in the stationary phase of growth. The methodology used has been reported previously and proved to be a reliable method for correlating in vivo efficacy in the rat tissue cage model of foreign-body infection (34, 47). The MBCs were defined as described above.

(ii) **Twenty-four-hour killing curve assays in log and stationary phases.** The methodology used for the killing curve assays in the log phase followed previous standardized recommendations (35), and that used for the 24-h killing curve assays in the stationary phase was previously described in detail (34).

The concentrations of antibiotics selected for the log-phase killing curve studies were those that represented subinhibitory and clinically achievable levels greater than the MIC, while the concentrations used for the stationary-phase studies were equivalent to peak and trough levels in tissue cage fluid (TCF).

For all experiments, bactericidal activity was defined as a ≥ 3 -log₁₀ decrease in the initial inoculum (in CFU/ml) at 24 h. The results of the combination treatments were compared with the results with the most active single drug; synergy, indifference, and antagonism were then defined as a ≥ 2 -log increase in killing, a < 2 -log change (increase or decrease) in killing, and a ≥ 2 -log decrease in killing, respectively.

To avoid carryover antimicrobial agent interference, the sample was placed on the plate in a single streak down the center and was allowed to absorb into the

* Corresponding author. Mailing address: Infectious Diseases Service, Hospital Universitari de Bellvitge, Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona 08907, Spain. Phone: 34.93.260.76.25. Fax: 34.93.260.76.37. E-mail: 32186omr@comb.es.

[∇] Published ahead of print on 1 August 2008.

agar until the plate surface appeared dry; the inoculum was then spread over the plate.

Animal studies. The animal model was approved by the Ethical Committee for Animal Experiments at the University of Barcelona.

The model was derived from that reported by Lucet et al. (32); we standardized this model using the methodology reported in our previous study (34). Briefly, two multiperforated Teflon tissue cages, each of which contained two polymethyl methacrylate coverslips, were subcutaneously implanted in the flank of a male Wistar rat. Three weeks later, a sample of TCF was obtained and checked for sterility; 0.1 ml of saline solution containing *S. aureus* (0.2×10^6 to 2×10^6 CFU/ml) was then inoculated into the tissue cage. Three weeks after inoculation (designated day 1), a sample of TCF was again recovered to quantify the bacterial counts. A minimum of 10^5 CFU/ml was required to include the sample in the therapeutic experiments; in all cases, each tissue cage was counted separately. Animals were killed only if both tissue cages were not valid for further use; thus, the rats used in the experiments had one or two valid tissue cages. The mean of the bacterial inoculum from the TCF included at the beginning of the experiments was 6.66 ± 0.88 log CFU/ml (mean \pm standard deviation). The animals were treated intraperitoneally for 7 days, and 24 h after the last dose (designated day 8), a sample of TCF was recovered and the bacterial counts were quantified. To avoid carryover, we proceeded as indicated above.

The therapeutic groups received the following: rifampin at 25 mg/kg of body weight/12 h, levofloxacin at 100 mg/kg/day, levofloxacin at 50 mg/kg/day, levofloxacin at 100 mg/kg/day plus rifampin, levofloxacin at 50 mg/kg/day plus rifampin, and a control treatment.

To investigate further the antimicrobial efficacy of high doses of levofloxacin alone and in combination with rifampin, additional *in vivo* studies were performed and treatment was continued for 14 days. We had previously analyzed the spontaneous evolution of experimental foreign-body infection in our animal model and found a chronic and stable infection until day 35 after inoculation (34). Thus, for these specific 14-day treatment experiments, TCF was obtained on day 8, as indicated above, and then the animals received the next dose of antibiotic and were treated for a further 7 days; no dose was missed. Twenty-four hours after the last dose (designated day 15), TCF was again obtained to quantify the bacterial counts, and finally, the animals were killed and the coverslips were recovered from the tissue cages. The therapeutic groups included in these experiments for the double evaluation of efficacy were limited to the groups receiving levofloxacin at 100 mg/kg/day plus rifampin, levofloxacin at 100 mg/kg/day alone, and the control treatment.

The differences in the bacterial counts from TCF samples at the beginning and end of treatment were used as the criteria for therapeutic efficacy; thus, we determined differences between the beginning and day 8 for all therapeutic groups and also between the beginning and day 15 exclusively for the three groups mentioned above. Once the rats had been killed at the end of 14 days of therapy, the coverslips were removed and processed to quantify bacterial counts.

All the procedures used to process the TCFs and coverslips have been reported to be harmless to the bacteria (9, 32) and have previously been described in detail (34).

Pharmacokinetic studies. Before the therapeutic experiments, the antibiotic dosages were selected according to pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters by using the methodology described in detail in our previous work (34). On the basis of previous data, we selected the dose whose pharmacodynamic parameters in TCF were close to those in human serum (12, 43); area under the concentration-time curve (AUC) values were adjusted for each antibiotic to allow similar ratios of AUC/MIC in both animals and humans (7, 27, 37). Peak and trough levels in TCF were determined on day 4 for each drug to check the equilibrium test concentrations during treatment.

The levels of antibiotics were determined by a bioassay method (6) with antibiotic medium 1 (Difco); thus, the free drug concentrations were used in all cases to make the comparisons more accurate. The microorganisms used were *Escherichia coli* ATCC 35218 for levofloxacin (lower limit of detection, 0.5 μ g/ml; for linearity of assay, $r^2 = 0.99$) and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 27626 for rifampin (lower limit of detection, 0.25 μ g/ml; for linearity of assay, $r^2 = 0.98$).

All main pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters determined for the selected doses were published in our previous report (34). We noted that the peak levels in TCF, the trough levels in TCF, the AUC for serum, the AUC for TCF, the AUC/MIC in TCF, and the maximum concentration (C_{max})/MIC in TCF were 12 mg/liter, 1.1 mg/liter, 106 μ g \cdot h/ml, 117 μ g \cdot h/ml, 234, and 24, respectively, for levofloxacin at 100 mg/kg/day; 6 mg/liter, 0.6 mg/liter, 77 μ g \cdot h/ml, 68 μ g \cdot h/ml, 136, and 13, respectively, for levofloxacin at 50 mg/kg/day; and 6.6 mg/liter, 3.8 mg/liter, 277 μ g \cdot h/ml, 304 μ g \cdot h/ml, 20,260, and 440, respectively, for rifampin.

For the combination of levofloxacin at 100 mg/day and rifampin, we deter-

mined the C_{max} of levofloxacin after 4 days of therapy in order to screen for potential interactions due to rifampin. The C_{max} was 11 mg/liter; thus, it did not significantly differ from that obtained with levofloxacin at 100 mg/day alone.

Resistance to antimicrobial agents. All therapeutic groups were screened for the development of levofloxacin and rifampin resistance at the end of therapy. In all cases, 100 μ l of TCF obtained directly and processed TCF from the coverslips was cultured in plates containing 1 mg/liter of either levofloxacin or rifampin. The results were expressed qualitatively as positive (with any macroscopic growth) or negative (with no macroscopic growth) (limit of detection, 10 CFU/ml).

Statistical analysis. All bacterial counts are presented as log CFU/ml (means \pm standard deviations). The data were found to be normally distributed when the Kolmogorov-Smirnov test was applied. The differences in the bacterial counts for the treated and the untreated animals were analyzed for statistical significance by analysis of variance. An unpaired Student's *t* test with the Bonferroni correction was used to determine statistical significance. For all tests, differences were considered statistically significant when *P* values were <0.05 .

RESULTS

In vitro studies. The MICs of levofloxacin and rifampin in the log phase were 0.5 and 1 μ g/ml, respectively, and the MBCs were 0.015 and 0.12 μ g/ml, respectively. The MBCs of both antibiotics in the stationary phase were 4 and >8 μ g/ml, respectively.

In the killing curve assays, levofloxacin proved to be bactericidal against both dividing and nondividing bacteria, although higher concentrations were required in the stationary-phase studies ($8\times$ MIC) than in the log-phase ones ($2\times$ MIC).

In vitro studies with rifampin alone yielded a wide range of results in killing activity that were related to differences in the inoculum size and the appearance of resistance during the studies. Rifampin showed bactericidal activity (at concentrations $8\times$ MIC) in the log phase, although a strictly adjusted inoculum of 10^5 CFU/ml was required; in contrast, small increases in inocula were associated with notorious decreases in killing, which did not reach more than 3 log CFU/ml. Thus, the MBC in the stationary phase, in which high inocula were needed, was >8 μ g/ml, yielding a high MBC/MIC ratio of 533.

The addition of rifampin to levofloxacin in the log phase showed antagonism at levofloxacin concentrations as low as $2\times$ MIC. When subinhibitory concentrations of levofloxacin were combined with rifampin, this antagonism was not seen. In contrast, the combination of levofloxacin and rifampin in the stationary phase showed an indifferent effect, although some decrease in the efficacy (tending toward antagonism) was observed when rifampin was added to levofloxacin at concentrations higher than its MBC. Figure 1 shows the killing curves in the log and stationary phases obtained with representative concentrations of levofloxacin plus rifampin. Note that the concentrations used in the stationary-phase studies were higher than those used in the log-phase studies.

Animal studies. (i) **Seven-day therapy.** Ten rats were not included because of inadequate bacterial counts. A total of 85 rats (170 tissue cages) were used, and among these rats, 7 rats had only one valid tissue cage. There were no significant differences between the groups in the bacterial counts from TCF at the beginning of experiments; these counts (mean \pm standard deviation) were as follows: 6.9 ± 0.8 log CFU/ml for rifampin, 6.74 ± 0.89 log CFU/ml for levofloxacin at 100 mg/kg/day, 6.4 ± 0.8 log CFU/ml for levofloxacin at 50 mg/kg/day, 6.74 ± 1 log CFU/ml for levofloxacin at 100 mg/kg/day plus

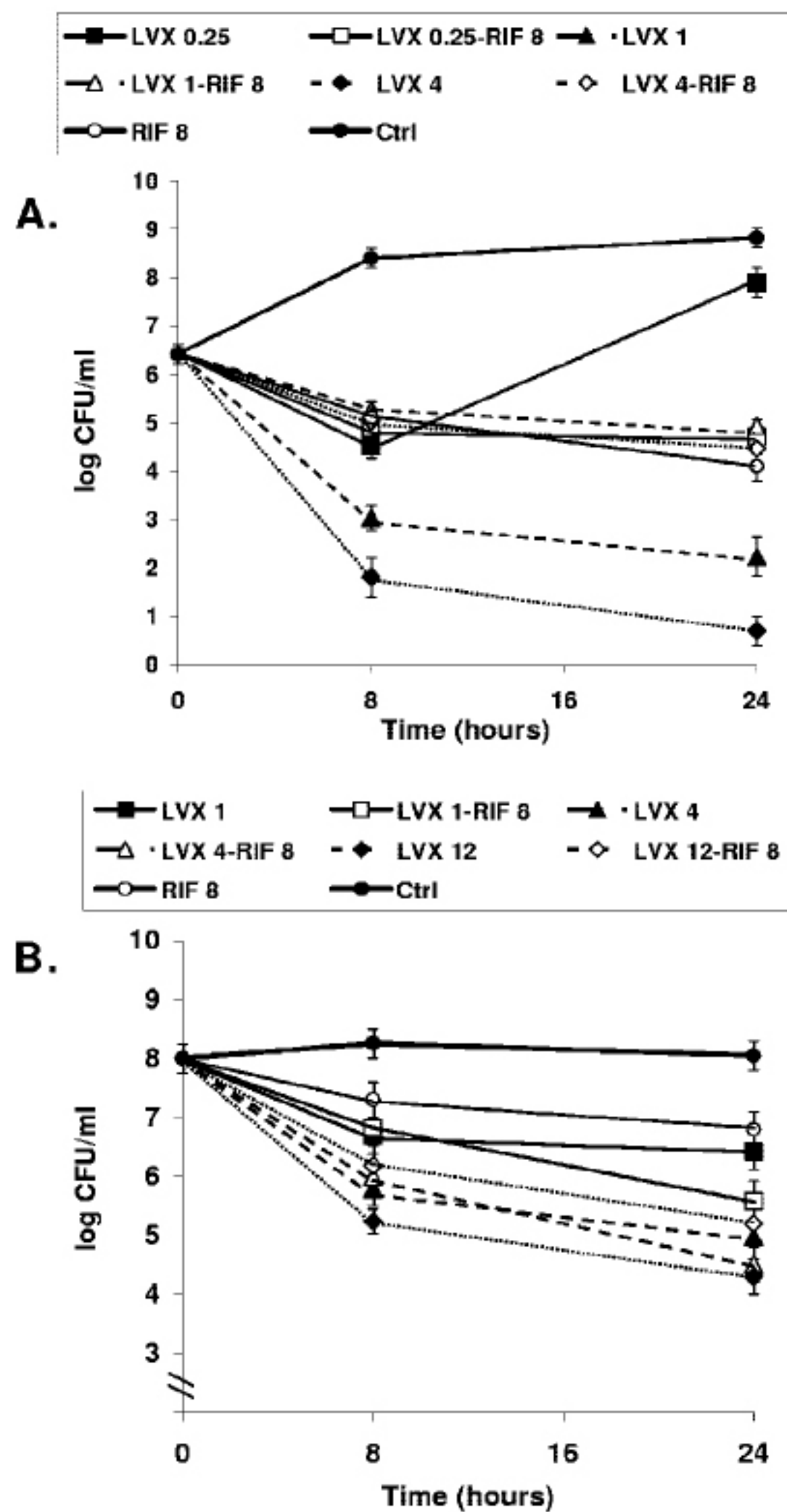


FIG. 1. Time-kill curves for strain in the log phase obtained with subinhibitory and clinically available concentrations ($\mu\text{g/ml}$) (A) and in the stationary phase obtained with the trough and peak concentrations (B) in TCF of rats treated with levofloxacin (LVX) alone and in combination with rifampin (RIF). Note that the levofloxacin concentrations used in the log-phase studies were lower than those used in the stationary-phase studies. In the stationary-phase studies, the trough concentrations of levofloxacin were equivalent to the subinhibitory ones in the log phase, whereas two peak concentrations of levofloxacin are represented as being equivalent to the peak levels of both dosages. The antagonistic effect obtained with the combination of levofloxacin and rifampin in the log phase was observed with levofloxacin at concentrations of 1 and 4 $\mu\text{g/ml}$ (LVX 1 and LVX 4, respectively), whereas the combination of levofloxacin at 12 $\mu\text{g/ml}$ (LVX 12) and rifampin in the stationary phase decreased the efficacy of levofloxacin at 12 $\mu\text{g/ml}$ alone by more than 1 log CFU/ml. Errors bars indicate standard deviations; in some cases, the bars are smaller than the symbols and so cannot be seen.

rifampin, 6.7 ± 1 log CFU/ml for levofloxacin at 50 mg/kg/day plus rifampin, and 6.8 ± 0.8 log CFU/ml for the controls.

At the end of the therapy, the counts for all therapeutic groups were better than those for the controls. Levofloxacin at high doses was the best treatment; it was significantly better than levofloxacin at 50 mg/kg/day ($P < 0.03$) and the combi-

nations of levofloxacin at 50 mg/kg/day plus rifampin and levofloxacin at 100 mg/kg/day plus rifampin ($P < 0.05$). The counts for the groups treated with rifampin alone did not show significant differences compared with those for the two groups treated with one of the levofloxacin doses plus rifampin.

Resistance to rifampin appeared in 90% of the rats treated with rifampin alone, whereas no rifampin- or levofloxacin-resistant strains appeared in the remaining groups.

A comparison of the final decreases in the log numbers of CFU/ml between the groups is shown in Fig. 2.

(ii) Fourteen-day therapy. At the end of 14 days of therapy, the bacterial counts were 2.9 ± 1.2 log CFU/ml for the group treated with levofloxacin at 100 mg/kg/day ($n = 21$), 3.37 ± 1.3 log CFU/ml for the group treated with levofloxacin at 100 mg/kg/day plus rifampin ($n = 21$), and 7.2 ± 0.6 log CFU/ml for the control group ($n = 15$). Levofloxacin alone was more active than levofloxacin in combination with rifampin, and the final efficacy for both groups was higher than that at the end of 7 days of therapy. The differences in the decrease in TCF bacterial counts (Fig. 2) between the two therapeutic groups that included levofloxacin alone and in combination with rifampin (0.5 log CFU/ml) were maintained over time, and levofloxacin alone was more active than levofloxacin in combination with rifampin, however; and probably because of the smaller number of animals, the differences in efficacy at the end of 14 days of therapy were not statistically significant. In contrast, analysis of the bacterial counts from the coverslips showed that the counts were significantly better for the group treated with levofloxacin alone ($P < 0.05$); these counts were 2.24 ± 1.3 log CFU/ml for the group treated with levofloxacin at 100 mg/kg/day, 3.3 ± 1.1 log CFU/ml for the group treated with levofloxacin at 100 mg/kg/day plus rifampin, and 5.4 log CFU/ml ± 1 for the control group.

At the end of 14 days of therapy, there were no rifampin- or levofloxacin-resistant strains in either TCF or coverslips.

DISCUSSION

The present study with a standardized rat model of *S. aureus* foreign-body infection provides information on the comparative efficacies of conventional and high doses of levofloxacin alone, and it is the first to test the differences in activity when both doses were combined with rifampin.

In our in vitro studies, we found that levofloxacin was bactericidal against *S. aureus* in both the log and the stationary phases, in agreement with the findings presented in previous reports (19, 28, 31, 34). In contrast, the efficacy of rifampin alone was greatly influenced by the inoculum size, as well as by the emergence of resistant strains. While rifampin has generally been considered an antimicrobial that is bactericidal for *S. aureus* (33, 38), contradictory results in this regard can often be found in the literature (1, 9, 18, 25). In our stationary-phase studies, where the presence of a high inoculum was needed, rifampin showed a moderate killing effect, but it was not strictly bactericidal. The bactericidal activity of rifampin against stationary-phase bacteria has been considered the basis for its main role in the treatment of staphylococcal foreign-body infections, although the MBC reported in the previous studies was always relatively high (between 3 and 4 $\mu\text{g/ml}$), with a very high stationary-phase MBC/MIC ratio (42, 47).

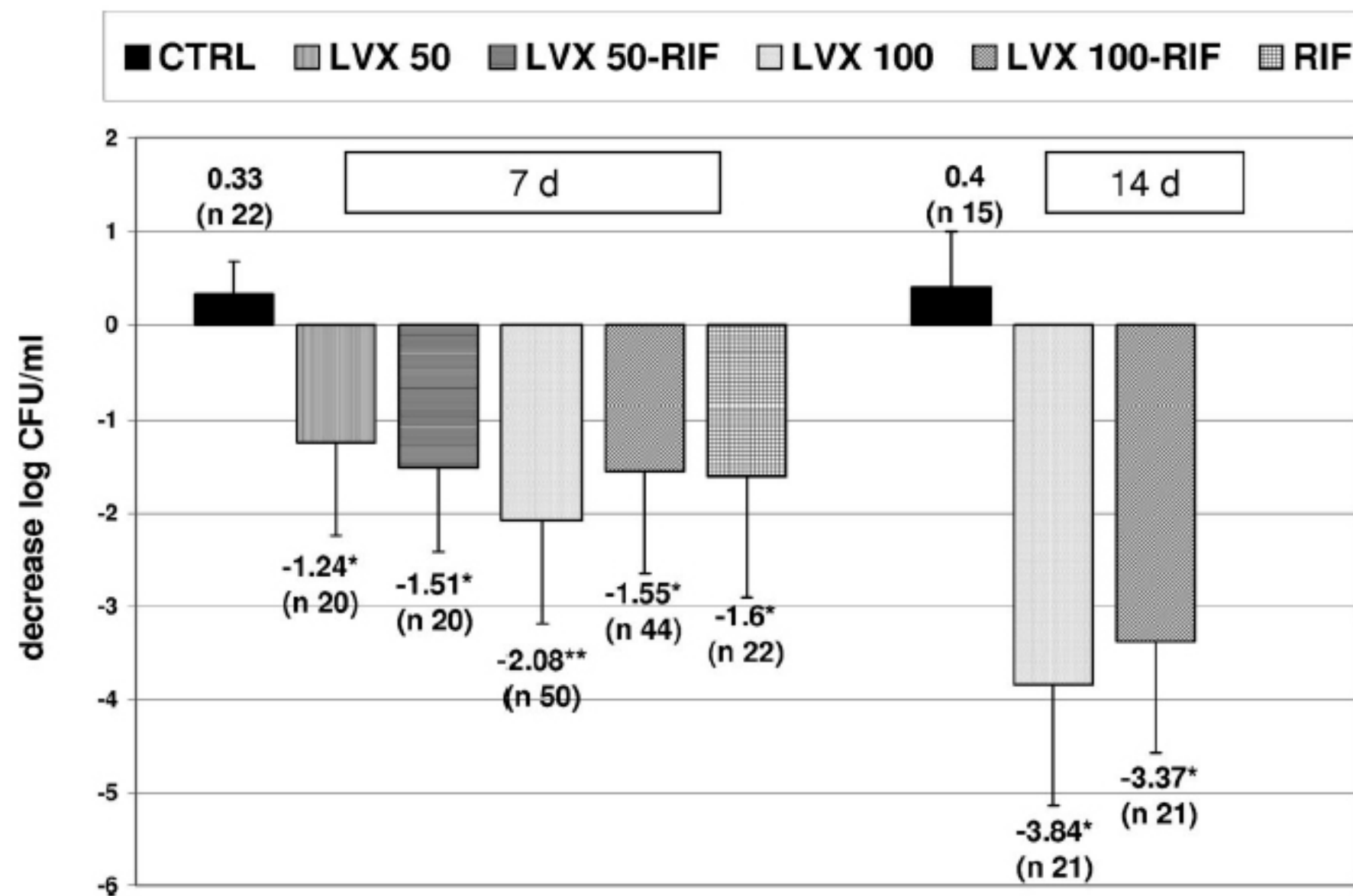


FIG. 2. Between-group comparisons of the decreases in bacterial counts from TCF (mean log CFU/ml) at the end of 7 days and 14 days of therapy. The n values represent the number of TCF samples and not the number of animals for each group. Note that the number of samples used for the two groups treated with levofloxacin at 100 mg/kg/day and levofloxacin at 100 mg/kg/day plus rifampin for the studies with 7 days of therapy was larger than that for the remaining therapeutic groups because the animals were maintained for a longer period. Differences in efficacy between the two therapeutic groups were maintained over time, although the number of samples included in the study with 14 days of therapy was less than that in the study with 7 days of therapy. Errors bars indicate standard deviations. Abbreviations and symbols: 7d, 7 days of therapy; 14d, 14 days of therapy; LVX, levofloxacin; RIF, rifampin; CTRL, control; *, $P < 0.05$ versus the results for the control; **, $P < 0.05$ versus the results for the groups treated with levofloxacin at 50 mg/kg/day (LVX 50) plus rifampin and levofloxacin at 100 mg/kg/day (LVX 100) plus rifampin and $P < 0.03$ versus the results for the groups treated with levofloxacin at 50 mg/kg/day and the controls.

The *in vitro* activity of the combination of fluoroquinolones plus rifampin, mainly in the log phase, is usually reported to be antagonistic (22, 24, 26). The inhibition of RNA synthesis by rifampin is responsible for abolishing the bactericidal killing activities of quinolones, which is related to the activity against DNA supercoiling (29, 30). However, the extent to which this activity of rifampin affects the activities of newer fluoroquinolones and its efficacy against nongrowing bacteria is not yet well known (21, 28). In this regard, Bahl et al. previously reported how the combination of ciprofloxacin and rifampin showed antagonism against growing *S. aureus* strains but only indifference against nongrowing strains (1). In our study, it should be noted that a decrease in the bactericidal activity of levofloxacin was also observed when rifampin was added to high concentrations of levofloxacin ($>8 \times$ MIC) in the stationary phase. In contrast, levofloxacin did not antagonize the activity of rifampin.

The clinical significance of the *in vitro* antagonism observed for the combination of rifampin plus fluoroquinolones has been of great concern. In fact, the combination of either ciprofloxacin or levofloxacin plus rifampin in animal models of staphylococcal endocarditis has been reported to produce an antagonistic effect (5, 24), whereas clinical studies have reported that the combination of ciprofloxacin and rifampin has beneficial effects (17). The combination of rifampin and ciprofloxacin or ofloxacin has demonstrated good efficacy in abscess, osteomyelitis, and foreign-body infection models; and accordingly, these combinations have been considered reference treatments for these human infections (2, 15, 16, 47, 49).

Currently, the use of high doses (750 to 1,000 mg/day) of

levofloxacin in combination with rifampin has been incorporated into clinical practice for the treatment of staphylococcal orthopedic prosthetic infections (48), although very limited information is available (3, 39). Thus, a recent study by Trampuz et al. described results similar to those previously reported with the combination of rifampin and classical fluoroquinolones when rifampin and levofloxacin were used at very low doses (C_{max} , 0.97 μ g/ml) in a guinea pig model of staphylococcal foreign-body infection (42).

In the present study, we confirmed the high level of efficacy of levofloxacin alone against staphylococci when it is used at high doses and that it is the best therapy, as we reported previously (34). The results obtained for the combined therapies showed that they have different activities, depending on the dose of levofloxacin used. While the addition of rifampin was beneficial with conventional doses of levofloxacin (C_{max} , 6 μ g/ml; AUC, 68 μ g \cdot h/ml), as reported in classical studies of fluoroquinolones plus rifampin (45, 47), the combination of rifampin with high doses of levofloxacin (C_{max} , 12 μ g/ml; AUC, 117 μ g \cdot h/ml) diminished the efficacy of the most active treatment, which was levofloxacin alone. The antagonistic effect of adding rifampin to high doses of levofloxacin was observed in TCF with treatment for the usual 7-day period and also in the coverslips with treatment for the prolonged 14-day period. It should be of interest that no differences in efficacy were found between the combination of rifampin with a conventional dose or a high dose of levofloxacin. With respect to the efficacy of rifampin alone, both combination therapies protected against the emergence of resistance, and no significant differences in final efficacies were noticed. Furthermore, no strains resistant

to levofloxacin or rifampin were detected by use of this 14-day treatment period, supporting the good safety profile against resistance development achieved with levofloxacin (13, 20), in contrast to that observed for classical quinolones (i.e., ciprofloxacin) (23). While some interaction between moxifloxacin and rifampin has been reported anecdotally (36), quinolone concentrations are not significantly altered by the addition of rifampin (41), as we noticed for the particular case of levofloxacin.

In conclusion, because of treatment efficacy and the safety profile against staphylococcal resistance, our results provide strong support for the potential use of levofloxacin at high doses alone as treatment for foreign-body infections. The clinical relevance of the antagonistic effect of adding rifampin in this setting should be further evaluated in patients receiving long-term therapy because of osteoarticular device infections. When use of the rifampin-levofloxacin combination is considered, the use of a high dosage of levofloxacin seems to offer a nonsignificant contribution to the efficacy of the combined therapy.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank C. Masuet of the Hospital Universitari de Bellvitge for her assistance with the statistical analysis.

This work was supported by a research grant from Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III (grant FIS 04/005), and grants from the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (grants REIPI C03/14 and REIPI RD06/0008). O.M. was supported by a grant from the REIPI.

REFERENCES

- Bahl, D., D. A. Miller, I. Leviton, P. Gialanella, M. J. Wolin, W. Liu, R. Perkins, and M. H. Miller. 1997. In vitro activities of ciprofloxacin and rifampin alone and in combination against growing and nongrowing strains of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1293–1297.
- Bamberger, D. M., M. T. Fields, and B. L. Herndon. 1991. Efficacies of various antimicrobial agents in treatment of *Staphylococcus aureus* abscesses and correlation with in vitro tests of antimicrobial activity and neutrophil killing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:2335–2339.
- Barberan, J., L. Aguilar, G. Carroquino, M. J. Gimenez, B. Sanchez, D. Martinez, and J. Prieto. 2006. Conservative treatment of staphylococcal prosthetic joint infections in elderly patients. *Am. J. Med.* **119**:993.e7–993.e10.
- Blaser, J., P. Vergeres, A. F. Widmer, and W. Zimmerli. 1995. In vivo verification of in vitro model of antibiotic treatment of device-related infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1134–1139.
- Chambers, H. F., Q. X. Liu, L. L. Chow, and C. Hackbarth. 1999. Efficacy of levofloxacin for experimental aortic-valve endocarditis in rabbits infected with viridans group streptococcus or *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:2742–2746.
- Chapin-Robertson, K., and S. C. Edberg. 1991. Measurements of antibiotics in human body fluids: techniques and significance, p. 295–366. In V. Lorian (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*. The Williams & Wilkins Co., New York, NY.
- Chow, A. T., C. Fowler, R. R. Williams, N. Morgan, S. Kaminski, and J. Natarajan. 2001. Safety and pharmacokinetics of multiple 750-milligram doses of intravenous levofloxacin in healthy volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2122–2125.
- Chuard, C., M. Herrmann, P. Vaudaux, F. A. Waldvogel, and D. P. Lew. 1991. Successful therapy of experimental chronic foreign-body infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antimicrobial combinations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:2611–2616.
- Chuard, C., J. C. Lucet, P. Rohner, M. Herrmann, R. Auckenthaler, F. A. Waldvogel, and D. P. Lew. 1991. Resistance of *Staphylococcus aureus* recovered from infected foreign body in vivo to killing by antimicrobials. *J. Infect. Dis.* **163**:1369–1373.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, 6th ed. M7-A6. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**:1318–1322.
- Craig, W. A. 1998. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin. Infect. Dis.* **26**:1–10.
- Cui, J., Y. Liu, R. Wang, W. Tong, K. Drlica, and X. Zhao. 2006. The mutant selection window in rabbits infected with *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* **194**:1601–1608.
- Drancourt, M., A. Stein, J. N. Argenson, R. Roiron, P. Groulier, and D. Raoult. 1997. Oral treatment of *Staphylococcus* spp. infected orthopaedic implants with fusidic acid or ofloxacin in combination with rifampicin. *J. Antimicrob. Chemother.* **39**:235–240.
- Drancourt, M., A. Stein, J. N. Argenson, A. Zannier, G. Curvale, and D. Raoult. 1993. Oral rifampin plus ofloxacin for treatment of *Staphylococcus*-infected orthopedic implants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:1214–1218.
- Dworkin, R., G. Modin, S. Kunz, R. Rich, O. Zak, and M. Sande. 1990. Comparative efficacies of ciprofloxacin, pefloxacin, and vancomycin in combination with rifampin in a rat model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* chronic osteomyelitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:1014–1016.
- Dworkin, R. J., B. L. Lee, M. A. Sande, and H. F. Chambers. 1989. Treatment of right-sided *Staphylococcus aureus* endocarditis in intravenous drug users with ciprofloxacin and rifampicin. *Lancet* **ii**:1071–1073.
- Eng, R. H., F. T. Padberg, S. M. Smith, E. N. Tan, and C. E. Cherubin. 1991. Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:1824–1828.
- Firsov, A. A., I. Y. Lubenko, S. N. Vostrov, Y. A. Portnoy, and S. H. Zinner. 2005. Antistaphylococcal effect related to the area under the curve/MIC ratio in an in vitro dynamic model: predicted breakpoints versus clinically achievable values for seven fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:2642–2647.
- Firsov, A. A., S. N. Vostrov, I. Y. Lubenko, K. Drlica, Y. A. Portnoy, and S. H. Zinner. 2003. In vitro pharmacodynamic evaluation of the mutant selection window hypothesis using four fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1604–1613.
- Fu, K. P., S. C. Lafredo, B. Foleno, D. M. Isaacson, J. F. Barrett, A. J. Tobia, and M. E. Rosenthal. 1992. In vitro and in vivo antibacterial activities of levofloxacin (*l*-ofloxacin), an optically active ofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:860–866.
- Hackbarth, C. J., H. F. Chambers, and M. A. Sande. 1986. Serum bactericidal activity of rifampin in combination with other antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**:611–613.
- Hooper, D. C., and J. S. Wolfson. 1991. Fluoroquinolone antimicrobial agents. *N. Engl. J. Med.* **324**:384–394.
- Kaatz, G. W., S. M. Seo, S. L. Barriere, L. M. Albrecht, and M. J. Rybak. 1989. Ciprofloxacin and rifampin, alone and in combination, for therapy of experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:1184–1187.
- Kaka, A. S., A. M. Rueda, S. A. Shelburne III, K. Hulten, R. J. Hamill, and D. M. Musher. 2006. Bactericidal activity of orally available agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**:680–683.
- Kang, S. L., M. J. Rybak, B. J. McGrath, G. W. Kaatz, and S. M. Seo. 1994. Pharmacodynamics of levofloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin, alone and in combination with rifampin, against methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* in an in vitro infection model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:2702–2709.
- Kucers, A., S. Crowe, M. L. Grayson, and J. Hoy. 1997. Rifampicin (rifampin), p. 676–708. In A. Kucers, S. Crowe, M. L. Grayson, and J. Hoy (ed.), *The use of antibiotics. A clinical review of antibacterial, antifungal and antiviral drugs*, 5th ed. Butterworth, Heinemann, Oxford, United Kingdom.
- Lewin, C. S., and S. G. Amyes. 1989. The bactericidal activity of DR-3355, an optically active isomer of ofloxacin. *J. Med. Microbiol.* **30**:227–231.
- Lewin, C. S., I. Morrissey, and J. T. Smith. 1991. The mode of action of quinolones: the paradox in activity of low and high concentrations and activity in the anaerobic environment. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **10**:240–248.
- Lewin, C. S., and J. T. Smith. 1988. Bactericidal mechanisms of ofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* **22**(Suppl. C):1–8.
- Lister, P. D. 2001. Pharmacodynamics of moxifloxacin and levofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in an in vitro pharmacodynamic model. *Clin. Infect. Dis.* **32**(Suppl 1):S33–S38.
- Lucet, J. C., M. Herrmann, P. Rohner, R. Auckenthaler, F. A. Waldvogel, and D. P. Lew. 1990. Treatment of experimental foreign body infection caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:2312–2317.
- Maduri, T. M., D. A. Goldmann, and P. Murphy. 1983. In vitro activity of rifampin in combination with oxacillin against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **23**:571–576.
- Murillo, O., A. Domenech, A. Garcia, F. Tubau, C. Cabellos, F. Gudiol, and J. Ariza. 2006. Efficacy of high doses of levofloxacin in experimental foreign-body infection by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:4011–4017.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1999. Methods for

- determining bactericidal activity of antimicrobial agents. M26-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA.
36. Nijland, H. M., R. Ruslami, A. J. Suroto, D. M. Burger, B. Alisjahbana, R. van Crevel, and R. E. Aarnoutse. 2007. Rifampicin reduces plasma concentrations of moxifloxacin in patients with tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* **45**: 1001–1007.
 37. Preston, S. L., G. L. Drusano, A. L. Berman, C. L. Fowler, A. T. Chow, B. Dornseif, V. Reichl, J. Natarajan, and M. Corrado. 1998. Pharmacodynamics of levofloxacin: a new paradigm for early clinical trials. *JAMA* **279**:125–129.
 38. Sabath, L. D., C. Garner, C. Wilcox, and M. Finland. 1976. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* to 65 antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **9**:962–969.
 39. Soriano, A., S. Garcia, G. Bori, M. Almela, X. Gallart, F. Macule, J. Sierra, J. A. Martinez, S. Suso, and J. Mensa. 2006. Treatment of acute post-surgical infection of joint arthroplasty. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**:930–933.
 40. Stewart, P. S., and J. W. Costerton. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**:135–138.
 41. Temple, M. E., and M. C. Nahata. 1999. Interaction between ciprofloxacin and rifampin. *Ann. Pharmacother.* **33**:868–870.
 42. Trampuz, A., C. K. Murphy, D. M. Rothstein, A. F. Widmer, R. Landmann, and W. Zimmerli. 2007. Efficacy of a novel rifamycin derivative, ABI-0043, against *Staphylococcus aureus* in an experimental model of foreign-body infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:2540–2545.
 43. Trampuz, A., M. Wenk, Z. Rajacic, and W. Zimmerli. 2000. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of levofloxacin against *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in human skin blister fluid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1352–1355.
 44. Vaudaux, P., P. Francois, C. Bisognano, J. Schrenzel, and D. P. Lew. 2002. Comparison of levofloxacin, alatrofloxacin, and vancomycin for prophylaxis and treatment of experimental foreign-body-associated infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 1503–1509.
 45. Widmer, A. F., R. Frei, Z. Rajacic, and W. Zimmerli. 1990. Correlation between in vivo and in vitro efficacy of antimicrobial agents against foreign body infections. *J. Infect. Dis.* **162**:96–102.
 46. Widmer, A. F., A. Gaechter, P. E. Ochsner, and W. Zimmerli. 1992. Antimicrobial treatment of orthopedic implant-related infections with rifampin combinations. *Clin. Infect. Dis.* **14**:1251–1253.
 47. Zimmerli, W., R. Frei, A. F. Widmer, and Z. Rajacic. 1994. Microbiological tests to predict treatment outcome in experimental device-related infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **33**:959–967.
 48. Zimmerli, W., A. Trampuz, and P. E. Ochsner. 2004. Prosthetic-joint infections. *N. Engl. J. Med.* **351**:1645–1654.
 49. Zimmerli, W., A. F. Widmer, M. Blatter, R. Frei, P. E. Ochsner, et al. 1998. Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: a randomized controlled trial. *JAMA* **279**:1537–1541.

OBJETIVO QUINTO.**Estudiar la eficacia del linezolid solo y en combinación con rifampicina en la infección estafilocócica de cuerpo extraño.**

Artículo 1. O. Murillo, A. Domenech, A. Garcia, F. Tubau, C. Cabellos, F. Gudiol, J. Ariza. "Efficacy of high doses of levofloxacin in experimental foreign-body infection by methicillin-susceptible *S. aureus*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2006; 50:4011-4017.

Artículo 5. O. Murillo, A. Doménech, G. Euba, R. Verdaguer, F. Tubau, J. Cabo, C. Cabellos, F. Gudiol, J. Ariza. "Efficacy of linezolid alone and in combination with rifampin in staphylococcal experimental foreign-body infection." Journal of Infection 2008; 57:229-235.

La eficacia de linezolid en solitario fue evaluada frente a otros tratamientos antiestafilocócicos de referencia; estos resultados se mostraron en el Artículo 1 y han sido expuestos anteriormente al abordar el objetivo 2. Por su parte, los resultados de la combinación de linezolid con rifampicina conforman la parte central del Artículo 5 en el que se comparó su eficacia frente a la de cloxacilina, en solitario y en combinación con rifampicina, y frente a la de rifampicina en solitario después de un tratamiento de 7 y 10 días de duración.

En los estudios *in vitro* mediante curvas de letalidad (Figura V.19), la combinación de linezolid con rifampicina mostró un efecto indiferente tanto en fase exponencial como estacionaria. Rifampicina tuvo un claro efecto de antagonismo sobre cloxacilina en fase exponencial, mientras que en fase estacionaria fue indiferente.

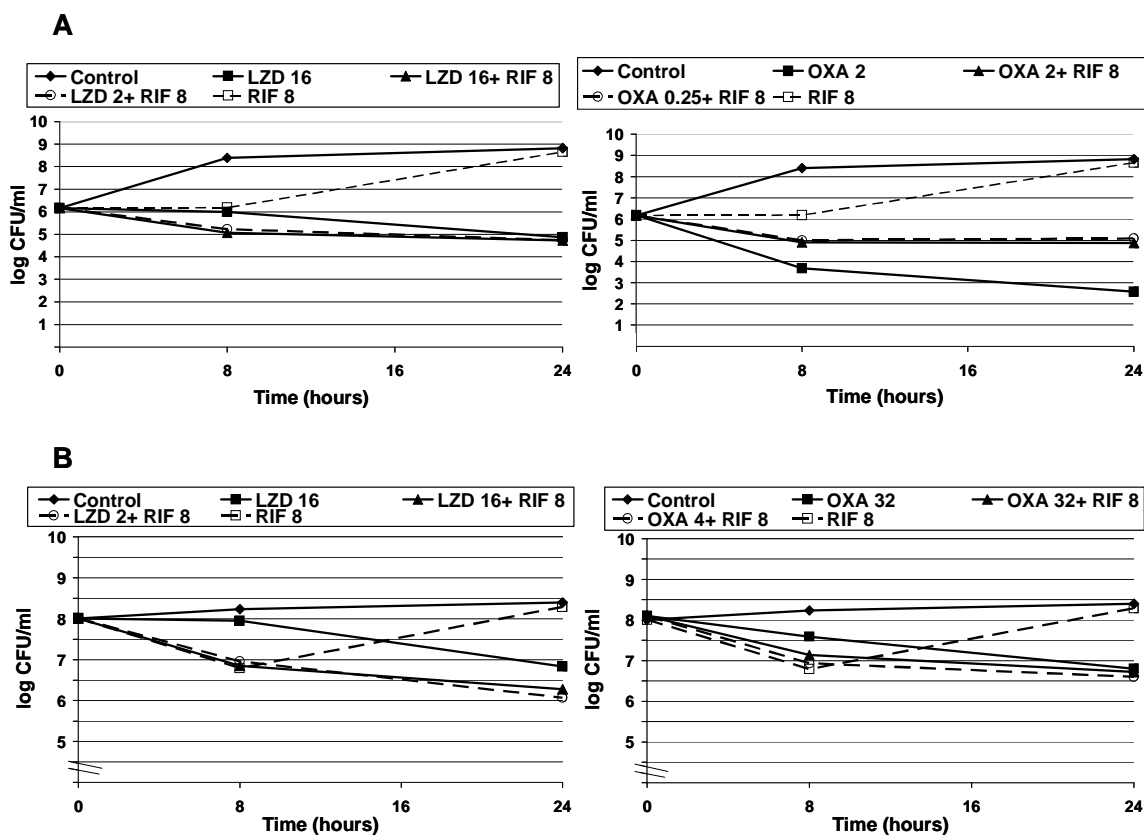


Figura V.19. Curvas de letalidad en fase exponencial (A) y estacionaria (B) con linezolid (LZD) y cloxacilina (OXA) en solitario y en combinación con rifampicina (RIF). En fase exponencial se muestran concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) subinhibitorias y clínicamente alcanzables, mientras en fase estacionaria se representan las concentraciones pico y valle en el líquido de las cajas.

En el modelo *in vivo* después de 7 días de tratamiento (Figura V.20), los tratamientos en monoterapia (cloxacilina y linezolid) fueron los menos eficaces siendo linezolid en solitario significativamente menos activo que rifampicina en monoterapia y que los dos tratamientos de combinaciones. La asociación de linezolid con rifampicina no mostró un efecto antagónico *in vivo* y presentó una eficacia similar a rifampicina en solitario con la que se desarrolló resistencia. Después de 10 días de tratamiento la combinación de linezolid y rifampicina (en la que no aparecieron cepas resistentes) fue la terapia más efectiva, seguida de linezolid en solitario y ambas fueron mejores de forma estadísticamente significativa a rifampicina en solitario en la que el 100% de las bacterias presentaron resistencia. De esta manera se puso de manifiesto la

eficacia conseguida por la terapia de combinación y su efecto de protección frente al desarrollo de resistencias a rifampicina (Figura V.21).

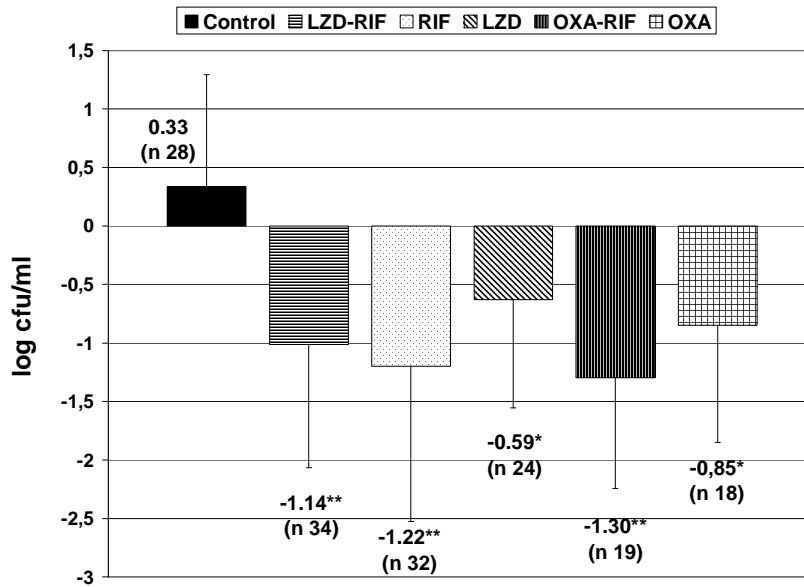


Figura V.20. Comparación entre grupos terapéuticos de los descensos de recuentos bacterianos en el líquido de las cajas (media de log UCF/ml \pm desviación estándar) al final del tratamiento de 7 días. Entre paréntesis se muestra el número de muestras de líquido de las cajas que es mayor para los grupos de linezolid (LZD) y rifampicina (RIF) en solitario y en combinación que para los de cloxacilina (OXA), porque algunos animales fueron tratados hasta los 10 días. * $P < 0.05$ vs controles; ** $P < 0.05$ vs controles y LZD.

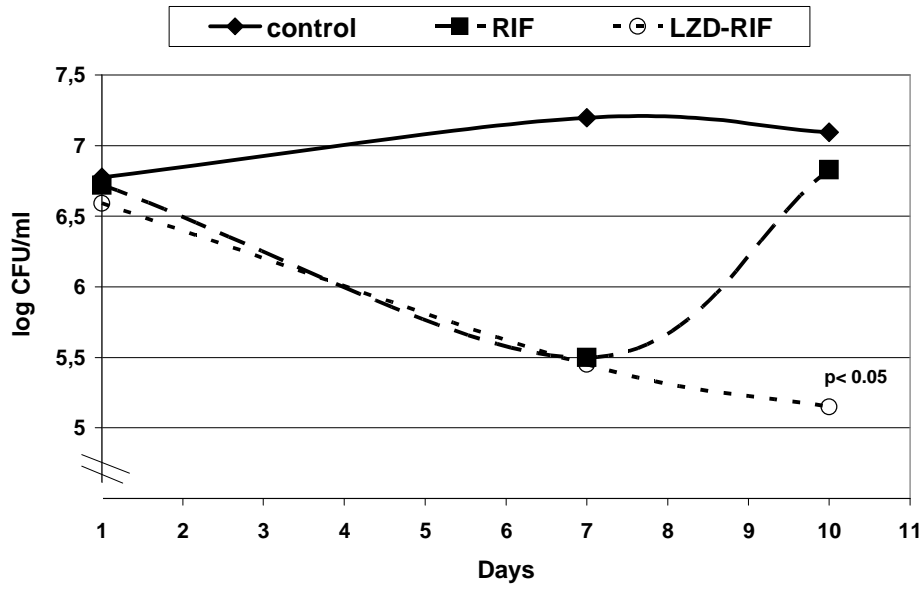


Figura V.21. Evolución de los recuentos bacterianos del líquido de las cajas a lo largo del tiempo (7 y 10 días). Se puede apreciar la total ineficacia de rifampicina al final del tratamiento de 10 días. $P < 0.05$ indica el aumento significativo de la eficacia con el tiempo (ANCOVA).

ANEXO

Artículo 5. O. Murillo, A. Doménech, G. Euba, R. Verdaguer, F. Tubau, J. Cabo, C. Cabellos, F. Gudiol, J. Ariza. "Efficacy of linezolid alone and in combination with rifampin in staphylococcal experimental foreign-body infection." *Journal of Infection* 2008; 57:229-235.



ELSEVIER



www.elsevierhealth.com/journals/jinf

Efficacy of linezolid alone and in combination with rifampin in staphylococcal experimental foreign-body infection

Oscar Murillo ^{a,*}, Alejandro Domenech ^a, Gorane Euba ^a, Ricard Verdager ^c, Fe Tubau ^c, Javier Cabo ^b, Carmen Cabellos ^a, Francesc Gudiol ^a, Javier Ariza ^a

^a Laboratory of Experimental Infection, Infectious Diseases Service, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, Feixa Llarga s/n, 08907 Barcelona, Spain

^b Orthopaedic Surgery Department, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, Feixa Llarga s/n, 08907 Barcelona, Spain

^c Microbiology Department, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, Feixa Llarga s/n, 08907 Barcelona, Spain

Accepted 5 July 2008

Available online 19 August 2008

KEYWORDS

Device infection;
Linezolid;
Rifampin;
S. aureus;
Animal models

Summary Objectives: The knowledge about efficacy of linezolid alone or in combination with rifampin in device infections is limited. We test their in vitro and in vivo efficacy in a rat model of foreign-body infection by methicillin-susceptible *S. aureus*.

Methods: In vitro studies for logarithmic and stationary bacteria were performed. In vivo efficacy (decrease in bacterial counts in tissue cage fluid) was evaluated at: (i) after 7-day therapy (groups: linezolid, cloxacillin, rifampin, linezolid–rifampin and cloxacillin–rifampin); and (ii) after 10-day therapy (groups: rifampin and linezolid–rifampin).

Results: After 7-day therapy all groups were significantly better than controls; linezolid ($\Delta\log$ cfu/ml: -0.59 , no resistant strains) and cloxacillin (-0.85) were the least effective therapy; linezolid was significantly less active ($P < 0.05$) than rifampin (-1.22 , resistance 90%), cloxacillin–rifampin (-1.3) and linezolid–rifampin (-1.14). After 10-day therapy linezolid–rifampin was the most effective treatment ($\Delta\log -1.44$, no resistance, $P < 0.05$); in contrast, rifampin resulted ineffective ($\Delta\log 0.1$) due to the growth of resistant strains (100%).

Conclusions: Linezolid alone showed moderate efficacy, whereas its combination with rifampin prevented the emergence of rifampin resistance. The efficacy of linezolid–rifampin combination was initially similar to that of rifampin alone, but in contrast to rifampin, it increased over time revealing the impact of protection against rifampin resistance and the benefits of rifampin activity.

© 2008 The British Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author. Infectious Diseases Service, Hospital Universitari de Bellvitge, Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 260 7625; fax: +34 93 260 7637.

E-mail address: 32186omr@comb.es (O. Murillo).

Introduction

The efficacy of antibiotic therapy in orthopedic prosthetic infections is limited by the presence of bacterial adherence and biofilms.^{1–3} Those cases in which arthroplasty retention may be tried pose the greatest challenge for the antimicrobial activity of antibiotics.⁴ In the context of staphylococcal infections, the role of rifampin is generally recognized,^{5–7} but the fact that resistance rapidly develops if it is administered alone makes it essential to use combinations with other antibiotics.^{8,9} Although good results have been reported using the prolonged combination of oral rifampin and fluoroquinolones, the treatment may sometimes fail.^{5,10,11} In addition, the progressive appearance of staphylococcal multi-resistance is generating increasing problems in this therapeutic approach.

One of the new drugs recently developed with good activity against gram-positive bacteria is linezolid, an oxazolidinone with excellent oral bioavailability and whose antimicrobial spectrum includes both methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *Staphylococcus* sp. It thus appears to be a promising drug for these infections and is already recommended in some clinical situations,¹² although reports of its efficacy against staphylococcal orthopedic prosthetic infections when given alone and in combination with rifampin are limited to a few case studies.^{13–16}

The animal model of foreign-body infection has been widely used and has provided relevant data about the efficacy of several antibiotics, alone and in combination, which may be applied to the treatment of human prosthetic infections.^{17–20} It includes bacterial populations attached to cover-slips forming a biofilm and others directly detached from them in the tissue cage fluid. Both populations are highly resistant to antibiotics², and the activity of antibiotics diminishes in parallel both bacterial populations.¹⁷ Using such a rat model, we recently reported the in vivo efficacy of different drugs, including linezolid, alone against methicillin-susceptible *S. aureus*.²¹ While linezolid is usually considered an alternative therapy against methicillin-resistant *S. aureus*, the limited information available on its efficacy in device infections prompted us to further study its antistaphylococcal activity in general in our developed model of foreign-body infection by methicillin-susceptible *S. aureus*. The present study aims to describe in greater detail the efficacy of linezolid alone and particularly in combination with rifampin in this setting using cloxacillin as a comparative standard of reference among antistaphylococcal drugs.

Materials and methods

Microorganism and determination of MICs and MBCs

We used a methicillin-susceptible *S. aureus* strain (ATCC 29213) that was susceptible to all antibiotics tested. The MIC using inoculum in the log-phase of growth and the MBC were determined according to standard recommendations.²² The MBCs in the stationary-phase were also determined using bacteria which were recovered from an overnight culture in TSB (Tripticase soy broth) and then

resuspended in a nutrient-restricted medium (PBS +1% glucose +4% MHB) that ensured a non-growing bacterial state. The methodology used was described in detail in our previous study.²¹

In vitro time-kill curves

Time-kill curves to test bactericidal activities were drawn against bacteria in the exponential- and stationary-phases of growth. In vitro studies in the log-phase were carried out following standard recommendations²³; the antibiotic concentrations tested were multiples of the MIC ($0.5\times$ – $512\times$ MIC), according to the drug used.

The methodology used in the stationary-phase studies was previously shown to be a reliable method to predict in vivo antimicrobial activity in foreign-body infections.²¹ We used bacteria in the stationary-phase, which were obtained as indicated above and resuspended in a nutrient-restricted medium. The prefixed concentrations of antibiotic tested in these studies were equivalent to peak and trough levels in tissue cage fluids (TCF); the concentrations ($\mu\text{g/ml}$) tested were 32 and 4 for cloxacillin; 16 and 2 for linezolid; 8 and 4 for rifampin and their respective combinations. To investigate possible synergy between combinations of two antibiotics, we also tested subinhibitory concentrations of drugs ($0.5\times$ MIC).

For both experiments (log and stationary-phases), bactericidal activity was defined as a ≥ 3 log₁₀ decrease in the initial inoculum in cfu/ml at 24 h. The results of combination were compared with the most active single drug; synergy, indifference and antagonism were then defined as a ≥ 2 log increase in killing, <1 log change (increase or decrease) in killing and ≥ 2 log decrease in killing, respectively.

To avoid carry-over antimicrobial agent interference, the sample was placed on the plate in a single streak down the center and allowed to absorb into the agar until the plate surface appeared dry; the inoculum was then spread over the plate.

Antimicrobial agents

For in vitro studies the purified powder of antibiotic was resuspended according to laboratory recommendations. For in vivo experiments the commercialized products were used, the necessary dilutions being performed to achieve a final volume that could be administered to animals. All antibiotics were supplied by their respective laboratories: rifampin (Aventis Pharma, Madrid, Spain), linezolid (Pfizer, Madrid, Spain) and cloxacillin (Normon, Madrid, Spain).

In vivo experiments

Animal model

The study was previously approved by the Ethical Committee for Animal Experiments at the University of Barcelona.

The animal model used was based on the model described by Lucet et al.,¹⁷ with minimal modifications. We have previously developed and standardized such a model and all the methodology is described in detail in our previous study.²¹ In brief, male Wistar rats (weight

220–250 g at the beginning of experiments) were used. Two multiperforated Teflon tissue cages (internal and external diameter of 10 and 12 mm, respectively; length 32 mm) containing two polymethyl methacrylate cover slips ($7 \times 7 \times 1$ mm) were subcutaneously implanted in each flank of the rats. Three weeks later, TCF was checked for sterility and infected with 0.1 ml of *S. aureus*. After 3 weeks (designated as day 1) TCF was percutaneously obtained to perform bacterial counts; those with fewer than 10^5 cfu/ml were excluded. Animals were then randomized to be treated for 7 days or to be left untreated; 12–24 h after the end of therapy (designated as day 8) TCF was again obtained to quantify bacterial counts. Differences in bacterial counts (expressed as log cfu/ml) between the beginning and end of therapy were considered as the criteria of efficacy.

The therapeutic groups used were as follows: linezolid (35 mg/kg/12 h), rifampin (25 mg/kg/12 h), linezolid plus rifampin, cloxacillin (200 mg/kg/12 h), cloxacillin plus rifampin and controls. Based on previous studies we selected doses that allowed pharmacodynamic values in TCF close to those achieved in human serum (see below).

To investigate further the antimicrobial efficacy of linezolid in combination with rifampin and to yield more information about this combined therapy against device infections, additional *in vivo* studies were performed, maintaining the treatment for 10 days. In this way, we had previously analysed the spontaneous evolution of experimental foreign-body infection in our animal model, showing a chronic and stable infection until day 35 after inoculation,²¹ whereas Lucet et al. reported the maintenance of infection for as long as 4 months after inoculation.¹⁷ Moreover, therapy had been administered for more than 7 days, just as Chuard et al. previously noted when they maintained treatments for 21 days.¹⁸ Thus, for these specific 10-day treatment experiments, TCF was obtained at day 8, as indicated above, and animals were treated for 3 days more; 24 h after the last dose (designated as day 11) TCF was again obtained to quantify bacterial counts and, finally, animals were sacrificed and cover slips recovered from tissue cages. Differences in counts between the beginning and days 8 and 11, respectively, were calculated and used as the criteria of efficacy. The therapeutic groups included in these experiments with double evaluation of efficacy were limited to linezolid plus rifampin, rifampin alone and controls.

Process of TCF and cover slips

The processing schedules were performed according to previous reports as being harmless for bacteria.^{2,17} Prior to culturing TCF samples they were sonicated (150 W \times 1 min; Afora, Madrid, Spain) to disrupt bacterial clumps, and 100 μ l of the sonicated fluids and their 10-fold dilutions were then plated on TSA with 5% sheep blood plates for 48 h at 37 °C; to avoid any carry-over antimicrobial effect we proceeded as described above in kill-curves.

Cover slips aseptically recovered from tissue cages were rinsed three times in 1 ml of phosphate buffered saline (PBS). They were then incubated in 1 ml of PBS with trypsin (6 U/ml; Sigma, Madrid, Spain) for 20 min at 37 °C and, finally, the remaining PBS was sonicated to recover adherent bacteria.

Pharmacokinetic studies

The pharmacokinetic studies were performed prior to therapeutic experiments to select the appropriate doses of each antibiotic. All the methodology used has been reported elsewhere.²¹ In brief, a single weight-adjusted dose of antibiotic was administered to a group of healthy animals, before obtaining samples of blood and TCF by cardiac and percutaneous puncture, respectively, at several time-points (after 1, 2, 3, 4, 8, 12 and 24 h, according to the drug). A minimum of four samples for each time-point and six time-points for each antibiotic were required.

The pharmacokinetic–pharmacodynamic (PK–PD) parameters determined were as follows: peak concentration (C_{max}), area under the curve over 24 h (AUC), the time the drug concentration remained above the MIC ($fT_{>MIC}$), AUC/MIC and C_{max}/MIC . Based on previous knowledge,^{24–26} we selected the dose of antibiotic achieving PD parameters in TCF equivalent to those obtained in human serum for the conventional doses. In all cases free-drug concentrations were determined using a bioassay method to make comparisons more accurately. To check the equilibrium concentration achieved, peak and trough levels were determined in TCF on day 4 of therapy.

All PK–PD parameters for the antibiotics used have been previously reported:²¹ the peak and trough concentrations (μ g/ml) in TCF were 43 and 3.8 for cloxacillin, 17.5 and 2.6 for linezolid, and 6.6 and 3.8 for rifampin, respectively.

Resistance to antimicrobial agents

Development of resistance at the end of therapy was screened in TCF and cover slips for those therapeutic groups including rifampin or linezolid. Samples were cultured on agar plates containing 4 mg/L of linezolid or 1 mg/L of rifampin. Results were expressed qualitatively as positive (with any macroscopic growth) or negative (with no growth).

Statistical analysis

All bacterial counts are presented as log cfu/ml (means \pm standard deviation). Data were found to be normally distributed when applying the Kolmogorov–Smirnov test. Analysis of variance (ANOVA) and Scheffe's correction were used to compare differences between groups in bacterial counts. Analysis of co-variance (ANCOVA) was used to compare differences between bacterial counts for a specific treatment at days 8 and 11. For all tests, differences were considered statistically significant when p values were <0.05 .

Results

In vitro studies

The MICs (μ g/ml) and MBCs (μ g/ml) in the exponential-phase and the MBCs for the stationary-phase for each antibiotic were, respectively, as follows: 4, 64, >256 for linezolid; 0.5, 1, >256 for cloxacillin; and 0.015, 0.12 and >8 for rifampin.

Kill curves with the most representative combinations are shown in Fig. 1. The concentrations of antibiotics ($\mu\text{g/ml}$) selected for the log-phase kill-curves were those representing subinhibitory and clinically achievable levels greater than the MIC (0.25, 2 for cloxacillin and 16, 2 for linezolid, respectively), while for the stationary-phase studies the concentrations used were equivalent to peak and trough levels in TCF (32, 4 for cloxacillin and 16, 2 for linezolid, respectively). In all cases these concentrations are represented in combination with peak levels of rifampin (8 $\mu\text{g/ml}$).

Time-kill curves for linezolid alone at concentrations equivalent to peak levels showed bacteriostatic activity against bacteria in the stationary-phase; the addition of clinically achievable doses of rifampin resulted in an indifference effect and did not reach bactericidal activity. Similarly, log-phase studies showed a bacteriostatic effect using linezolid alone and indifference with combinations.

The combinations of cloxacillin and rifampin in the stationary-phase studies proved indifferent and showed bacteriostatic activity (even at peak levels for both antibiotics). On the other hand, cloxacillin alone in log-phase experiments reached bactericidal activity (even at lower concentration such as $2\times$ MIC), whereas the addition of rifampin produced an antagonism effect.

Rifampin alone in the stationary-phase finally reached little or no activity due to regrowth after 8 h, which was not observed when combinations were tested. The addition of subinhibitory concentrations of linezolid and cloxacillin to

rifampin (at therapeutic doses) did not achieve bactericidal activity in either the log- or stationary-phase studies; however, these combinations did tend to show synergism.

Animal studies

Evaluation of 7-day therapy

A total of 90 rats (180 tissue cages) were used in the experiments. There were no statistical differences in bacterial counts at day 1 between several therapeutic groups; these initial quantitative counts in TCF (mean log cfu/ml \pm SD) were as follows: 6.52 ± 0.77 (linezolid), 6.79 ± 1 (cloxacillin), 6.76 ± 0.86 (rifampin), 6.51 ± 0.72 (linezolid plus rifampin), 6.47 ± 0.94 (cloxacillin plus rifampin) and 6.77 ± 0.76 (controls). At the end of 7-day therapy all therapies proved better than controls ($P < 0.05$); the final decreases in bacterial counts from TCF (mean log cfu/ml \pm SD) were as follows: -0.59 ± 0.9 (linezolid), -0.85 ± 1 (cloxacillin), -1.22 ± 1.3 (rifampin), -1.14 ± 1 (linezolid plus rifampin), -1.3 ± 0.9 (cloxacillin plus rifampin) and 0.33 ± 0.9 (controls). Linezolid and cloxacillin alone were the least effective treatments; linezolid alone was significantly ($P < 0.05$) less active than rifampin alone, linezolid-rifampin and cloxacillin-rifampin (unpaired Student's *T*-test was used because of differences in the number of samples between groups). Cloxacillin-rifampin was better than cloxacillin alone, although it did not reach statistical significance (probably because the less number of samples). Finally, there were no statistical differences

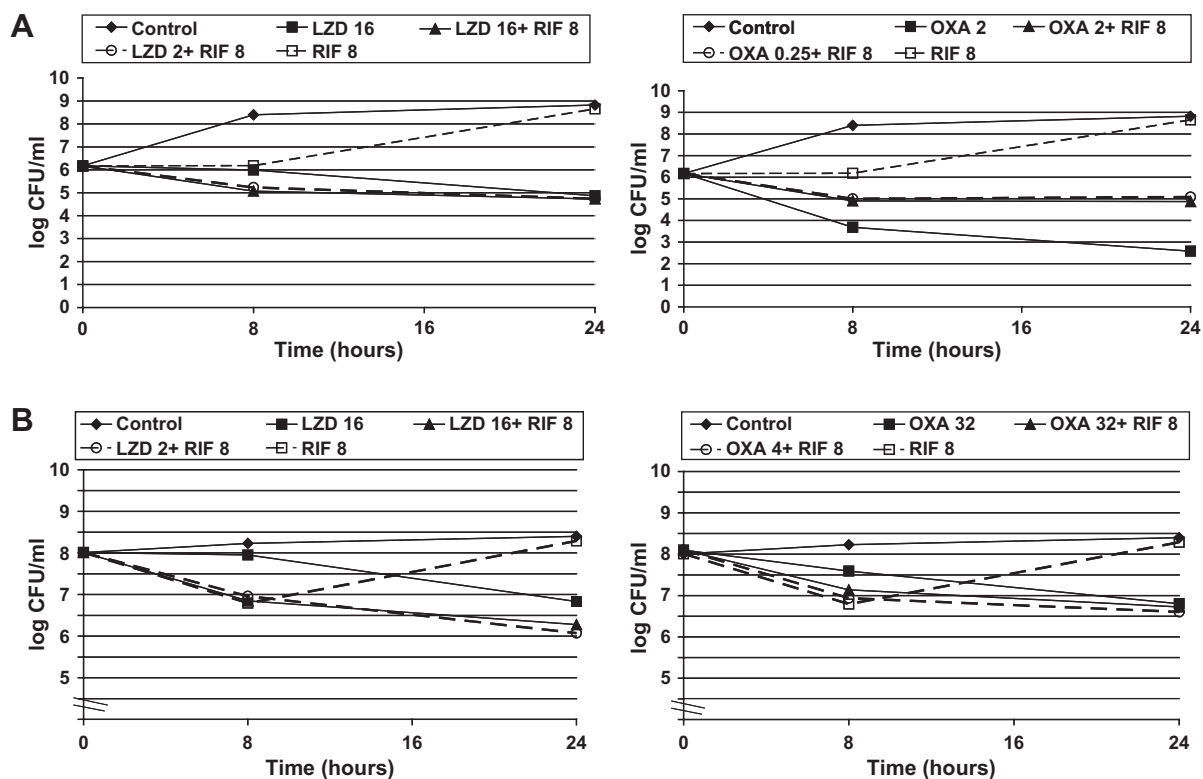


Figure 1 Time-kill-curves for log-phase (A) and stationary-phase (B) with clinically representative concentrations ($\mu\text{g/ml}$). The peak and trough levels in TCF were used in the stationary-phase studies, whereas the peak and subinhibitory concentrations were used in the log-phase, respectively (we noted that lower concentrations for cloxacillin were needed in the log-phase). Abbreviations: OXA, cloxacillin; LZD, linezolid; RIF, rifampin.

between rifampin alone and both combined therapies. A comparison of final efficacy at the end of therapy is shown in Fig. 2.

Screening of resistance was performed in bacteria recovered from TCF and cover-slips; it showed no rifampin-resistant strains in any combined therapy (whether linezolid or cloxacillin), whereas resistance was observed in 90% of cases of rifampin alone. Linezolid resistance was not observed.

Evaluation of 10-day therapy

The final decreases in bacterial counts at the end of 10-day therapy (mean log cfu/ml \pm SD) were -1.44 ± 1.1 (linezolid plus rifampin, $n = 20$), 0.1 ± 1.1 (rifampin, $n = 18$) and 0.4 ± 0.8 (controls, $n = 18$). Linezolid in combination with rifampin proved better than controls and rifampin alone ($P < 0.05$, ANOVA). The efficacy of linezolid in combination with rifampin significantly increased over time ($P < 0.05$, ANCOVA), a finding which was not observed for rifampin alone. The evolution of bacterial counts over time is represented in Fig. 3.

Rifampin resistance was not observed, either in TCF or in cover-slips, when used in combination with linezolid, whereas it was detected in 100% of cases in the rifampin-alone group. Linezolid-resistant strains were not detected.

Discussion

This study tests the in vitro and in vivo antimicrobial efficacy of linezolid alone and in combination with rifampin in a rat model of foreign-body infection by methicillin-susceptible *S. aureus* using cloxacillin as a comparative standard of reference among antisatphylococcal drugs. The results provide information that may be useful in treating patients with staphylococcal orthopedic prosthetic or other biomaterial-associated infections.

While in vitro studies are usually performed against bacteria in the log-phase, experiments using bacteria in the

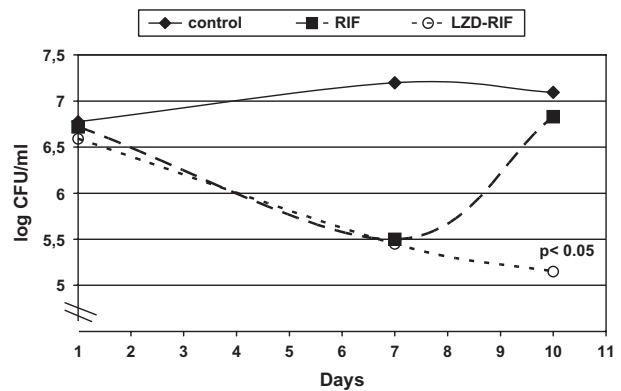


Figure 3 Evolution of bacterial counts (log cfu/ml) from TCF over time. Abbreviations: OXA, cloxacillin; LZD, linezolid; RIF, rifampin. $P < 0.05$ indicates significantly increases over time (ANCOVA).

stationary-phase could be more reliable as regards antimicrobial efficacy in foreign-body infections, since both these in vitro non-growing and biofilm bacteria express tolerance to antimicrobials. We previously standardized stationary-phase in vitro studies and reported good results, correlating them to those obtained in vivo in a rat model.²¹ In the present study, in vitro experiments were performed against bacteria in both the log and stationary-phases. One of the findings of note is the differences observed for combinations of cloxacillin plus rifampin, which showed antagonism in the log-phase and indifference in the stationary-phase studies. However, the combination of linezolid and rifampin showed indifference in both phases and no antagonism for any combination of different antibiotic concentrations; these results agree with those reported in previous studies, although these were usually performed against bacteria in the log-phase.²⁷⁻²⁹ Neither the combination of linezolid plus rifampin nor cloxacillin plus rifampin achieved bactericidal activity against non-growing bacteria. Although the study of development of rifampin resistance was not the aim of the in vitro experiments, we did not observe macroscopic bacterial growth at the end of 24-h kill curves using linezolid plus rifampin, whereas this did appear when using rifampin alone. This could support the protection against rifampin resistance offered by linezolid, as previously reported.^{27,28}

The fact that linezolid can be orally administered could be an advantage in treating orthopedic prosthetic infections due to the need for long-term therapies. However, despite these potential benefits, reports of the efficacy of linezolid alone and in combination with rifampin against prosthetic infections are limited to a few case studies.¹³⁻¹⁶ The animal model used in this study has proved to be a reliable method in mimicking foreign-body infection. To our knowledge, the combination of linezolid and rifampin in this setting had not yet been tested, whereas the efficacy of linezolid alone against methicillin-susceptible *S. aureus* was previously reported by our group in comparison with other antistaphylococcal drugs.²¹ In that study, linezolid alone was the poorest active treatment and we concluded that it could be more useful in the context of multidrug resistant *S. aureus* infections, when few alternative therapies exist.

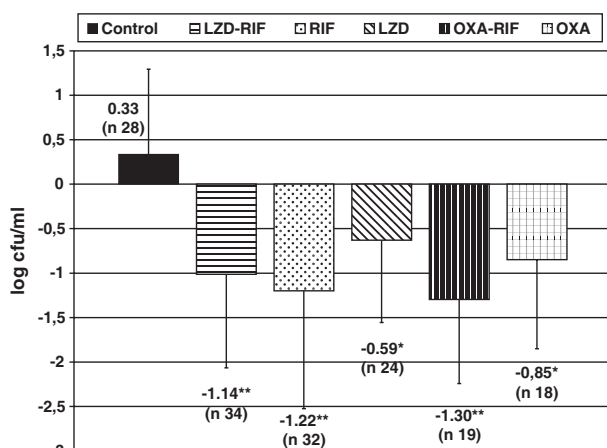


Figure 2 Comparison of decreases in log cfu/ml (mean) from TCF between groups at the end of 7-day therapy. Errors bars indicate standard deviations. The number of tissue cages is shown in square brackets. Abbreviations: OXA, cloxacillin; LZD, linezolid; RIF, rifampin. * $P < 0.05$ versus control; ** $P < 0.05$ versus control and LZD.

In the present study we confirmed that while all therapeutic groups were significantly more efficacious than controls, monotherapies with linezolid and cloxacillin alone were the least effective therapies. Linezolid was significantly worse than rifampin alone and rifampin combinations; however, the combination of linezolid plus rifampin for 7 days proved to be as efficacious as rifampin alone and the combination of cloxacillin and rifampin, the latter could be considered as a standard of reference among antistaphylococcal combined therapies including rifampin. The combination cloxacillin–rifampin tended to be more effective than cloxacillin alone, but it did not reach statistical significance probably due to the less number of samples used. Overall, the most important finding obtained with combined therapies, whether linezolid–rifampin or cloxacillin–rifampin, was protection against the emergence of resistant strains; thus, given the key role of rifampin against device infection the benefits of such resistance prevention might be of particular interest.

Therapeutic experiments with the rat tissue cage model of foreign-body infection have previously been used to reveal the progressive effects of therapies, and have shown that in some cases they remained curative when maintained for 3 weeks.¹⁸ Here we carried out treatment for 10 days in order to test the efficacy reached by linezolid in combination with rifampin and to evaluate better the protection offered by this combination against the emergence of rifampin-resistant strains. At this time (10 days), the protective effect against the development of rifampin resistance was clearly observable; the combination was the most active therapy and no resistance appeared (neither for rifampin nor linezolid), in contrast to what occurs with rifampin alone. While at the end of 7-day therapy the appearance of up to 90% of resistant strains when using rifampin alone had no obvious effects on the antimicrobial efficacy of the schedule, after 10 days of treatment the growth of this resistant population led to its total ineffectiveness. In addition, the evaluation of efficacy over time, comparing the results obtained at the end of 7- and 10-day therapies, showed a progressive and significant increase for linezolid-plus-rifampin.

We conclude that linezolid alone showed only moderate efficacy, as well as that of cloxacillin alone, in this model of foreign-body infection by *S. aureus*, whereas its combination with rifampin was shown to prevent the emergence of rifampin resistance. The efficacy of this combination was similar to that of rifampin alone during the first days of therapy, but in contrast to rifampin alone it increased over time, thus revealing its ability to protect against the development of resistance and maintain the benefits of rifampin activity against staphylococcal device infections. The efficacy of linezolid and rifampin in comparison with other combined therapies should be further evaluated according to the alternative therapies for the staphylococcal strain responsible of the foreign-body infection.

Acknowledgments

We thank C. Masuet, from Hospital Universitari de Bellvitge, for her assistance in the statistical analysis. This work was supported by a research grant from Ministerio de Sanidad y

Consumo, Instituto de Salud Carlos III (FIS 04/005), Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI C03/14) and Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD06/0008), and by a grant from Pfizer (Spain). O. M. was supported by a grant from the REIPI, and A. D. by a grant from the Universidad de Barcelona.

References

1. Costerton JW, Stewart P, Greenberg EP. Bacterial biofilm: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;**284**: 1318–22.
2. Chuard C, Lucet JC, Rohner P, Herrmann M, Auckenthaler R, Waldvogel FA, et al. Resistance of *Staphylococcus aureus* recovered from infected foreign body in vivo to killing by antimicrobials. *J Infect Dis* 1991;**163**:1369–73.
3. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001;**358**:135–8.
4. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med* 2004;**351**:1645–54.
5. Zimmerli W, Widmer AF, Blatter M, Frei R, Ochsner PE. Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections. *JAMA* 1998;**279**:1537–41.
6. Widmer AF, Frei R, Rajacic Z, Zimmerli W. Correlation between in vivo and in vitro efficacy of antimicrobial agents against foreign body infections. *J Infect Dis* 1990;**162**:96–102.
7. Zimmerli W, Frei R, Widmer AF, Rajacic Z. Microbiological test to predict treatment outcome in experimental device-related infections due to *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1994;**33**:959–67.
8. Widmer AF, Gaechter A, Ochsner PE, Zimmerli W. Antimicrobial treatment of orthopedic implant-related infections with rifampin combinations. *Clin Infect Dis* 1992;**14**:1251–3.
9. Eng RH, Smith SM, Tillem M, Cherubin C. Rifampin resistance. Development during the therapy of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Arch Intern Med* 1985;**145**: 146–8.
10. Drancourt M, Stein A, Argenson JN, Zannier A, Curvale G, Raoult D. Oral rifampin plus ofloxacin for treatment of *Staphylococcus*-infected orthopedic implants. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;**37**:1214–8.
11. Drancourt M, Stein A, Argenson JN, Roiron R, Groulier P, Raoult D. Oral treatment of *Staphylococcus* spp. infected orthopaedic implants with fusidic acid or ofloxacin in combination with rifampin. *J Antimicrob Chemother* 1997;**39**: 235–40.
12. Chien JW, Kucia ML, Salata RA. Use of linezolid, an oxazolidinone in the treatment of multidrug-resistant gram-positive bacterial infections. *Clin Infect Dis* 2000;**30**:146–51.
13. Bassetti M, Vitale F, Melica G, Righi E, Di Bagio A, Molfetta L, et al. Linezolid in the treatment of gram-positive prosthetic joint infections. *J Antimicrob Chemother* 2005;**55**:387–90.
14. Jover-Saenz A, Gaité FB, Ribelles AG, Porcel-Perez JM, Garcia-Calvo S. Linezolid treatment of total prosthetic knee infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect* 2003;**47**:87–8.
15. Bassetti M, Di Bagio A, Cenderello G, Del Bono V, Palermo A, Cruciani M, et al. Linezolid treatment of prosthetic infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect* 2001;**43**:148–9.
16. Soriano A, Gómez J, Gómez L, Azanza JR, Perez R, Romero F, et al. Efficacy and tolerability of prolonged linezolid therapy in the treatment of orthopedic implant infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007;**26**:353–6.
17. Lucet JC, Herrmann M, Rohner P, Auckenthaler R, Waldvogel FA, Lew DP. Treatment of experimental foreign

- body infection caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;**34**:2312–7.
18. Chuard C, Herrmann M, Vaudaux P, Waldvogel FA, Lew DP. Successful therapy of experimental chronic foreign-body infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antimicrobial combinations. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;**35**:2611–6.
 19. Schaad HJ, Chuard C, Vaudaux P, Rohner P, Waldvogel FA, Lew DP. Comparative efficacies of imipenem, oxacillin and vancomycin for therapy of chronic foreign body infection due to methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1994;**33**:1191–200.
 20. Vaudaux P, Francois P, Bisognano C, Schrenzel J, Lew DP. Comparison of levofloxacin, alatrofloxacin and vancomycin for prophylaxis and treatment of experimental foreign-body-associated infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;**46**:1503–9.
 21. Murillo O, Doménech A, García A, Tubau F, Cabellos C, Gudiol F, et al. Efficacy of high doses of levofloxacin in experimental foreign-body infection by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;**50**:4011–7.
 22. *Clinical and Laboratory Standards Institute, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 6th ed. Approved Standard M7–A6*. Wayne, Pennsylvania, USA: CLSI; 2005.
 23. *National Committee for Clinical Laboratory Standards, Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents M26-A*. Villanova, PA, USA: NCCLS; 1999.
 24. Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* 1998;**26**:1–12.
 25. Ryan M, Hodges B, Spencer GR, Harding SM. Simultaneous comparison of three methods for assessing ceftazidime penetration into extravascular fluid. *Antimicrob Agents Chemother* 1982;**22**:995–8.
 26. Trampuz A, Wenk M, Rajacic Z, Zimmerli W. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of levofloxacin against *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in human skin blister fluid. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;**44**:1352–5.
 27. Jacqueline C, Caillon J, Le Mabeque V, Miegerville AF, Donnio PY, Bugnon D, et al. In vitro activity of linezolid alone and in combination with gentamicin, vancomycin or rifampin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by time-kill curve methods. *J Antimicrob Chemother* 2003;**51**:857–64.
 28. Grohs P, Kitzis M, Gutmann L. In vitro bactericidal activities of linezolid in combination with vancomycin, gentamicin, ciprofloxacin, fusidic acid, and rifampin against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;**47**:418–20.
 29. Soriano A, Jurado A, Marco F, Almela M, Ortega M, Mensa J. In vitro activity of linezolid, moxifloxacin, levofloxacin, clindamycin and rifampin, alone and in combination, against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Rev Esp Quimioterap* 2005;**18**:168–72.

DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

1. Modelo de infección de cuerpo extraño por *S. aureus* meticilín sensible en ratas.

El modelo de infección de cuerpo extraño con cajas de Teflón había sido ampliamente utilizado en ratas y cobayas (60;70); nosotros elegimos estandarizar un modelo de infección en la rata, ya que permitía tratamientos más prolongados y nuestro objetivo era el estudio de la eficacia de la antibioterapia como una aproximación a la problemática clínica del tratamiento de la infección de prótesis articular. Se trata de un modelo que reproduce adecuadamente las principales características de la infección de prótesis articular como son la tolerancia a los antibióticos y el desarrollo de un biofilm con bacterias adheridas a una superficie artificial. Asimismo, el modelo en ratas produce una infección crónica que se mantiene con recuentos bacterianos estables en el tiempo (más allá de 6 semanas según nuestra propia experiencia y hasta 4 meses según otros autores), con un importante componente inflamatorio que lo asemeja a una infección purulenta asociada a cuerpo extraño (60). La selección de la dosis de antibiótico a administrar en los animales es un aspecto fundamental en estudios experimentales de eficacia ya que se pretende extrapolar los resultados obtenidos al ámbito humano (74;84). En nuestro caso con los estudios de farmacocinética-farmacodinámica (PK-PD) en los animales buscamos reproducir siempre la dosificación utilizada en la práctica clínica y no otras que representarían dosis no alcanzables en humanos. La particularidad de nuestro modelo animal reside en la existencia de dos compartimentos (intravascular y local en el líquido de las cajas) en los que se pueden realizar estudios de PK-PD, lo que permite evaluar la farmacodinámica de la antibioterapia in situ y su actividad en el lugar de la infección de cuerpo extraño. La relación de la farmacocinética en ambos compartimentos y el hecho de que las concentraciones de antibiótico en el líquido de las cajas se eliminen más lentamente que en suero, permite una dosificación más espaciada que viene determinada por estas concentraciones locales (74;82-84); en particular todos los antibióticos pudieron ser administrados cada 12 o 24 horas lo cual supone una ventaja al llevar a cabo un modelo basado en tratamientos de larga

duración. La eficacia obtenida con cualquiera de las pautas de antibioterapia tras una semana de administración fue relativamente reducida, e inclusive tras 2 semanas de prolongación, nunca observamos una erradicación de la infección. Esta exigente particularidad del modelo condicionó una mayor dificultad para objetivar diferencias significativas entre los diferentes grupos terapéuticos y la necesidad de incluir un importante número de muestras en cada uno de ellos. La larga duración del experimento terapéutico, 7 u 8 semanas desde la implantación inicial de las cajas de Teflón hasta el final del tratamiento antibiótico, condicionó también una pérdida no despreciable de muestras inicialmente válidas (alrededor de un 20%) debido a la expulsión espontánea por fistulización de las cajas. Evaluado en su conjunto, el modelo mostró una gran reproducibilidad y la ventaja de proporcionar una infección de cuerpo extraño mantenida en el tiempo, si bien su realización comportó un costoso trabajo por la larga duración del experimento y su rentabilidad se vio limitada por la dificultad para documentar las diferencias de eficacia entre las diversas pautas terapéuticas.

Otro elemento destacable del modelo es su importante componente inflamatorio-purulento, en cierto modo indicativo del papel destacado que comporta el fracaso de las células fagocíticas, funcionalmente deficientes en contacto con el cuerpo extraño, en el mantenimiento de estas infecciones (22;39). En nuestros experimentos, fue muy destacable el gran número de células fagocíticas presentes en el líquido de las cajas, con un elevado porcentaje de bacterias en su interior respecto del total de inóculo bacteriano. Ello sugirió que la eficacia de una pauta antibiótica determinada podría depender en gran parte de su actividad a nivel intracelular. De esta forma, consideramos que nuestro modelo evaluó concomitantemente la eficacia antibiótica frente a bacterias incluidas en el biofilm y en contacto con el cuerpo extraño (con metabolismo mínimo y tolerancia antibiótica) y frente a bacterias intracelulares que igualmente pueden expresar tolerancia y ser más difíciles de erradicar por las dificultades de alcanzar concentraciones eficaces de antibiótico en esta localización.

La evaluación del desarrollo de resistencias a los antibióticos durante el tratamiento es otro aspecto importante de estudio en las enfermedades infecciosas. En este sentido, el modelo permite analizar dos poblaciones bacterianas recuperadas localmente del lugar de la infección de cuerpo extraño: las adheridas a la pieza de

metacrilato y las del líquido inflamatorio en contacto con ella. Una vez obtenidas las bacterias *ex vivo* expuestas al antibiótico durante días, se procedió a la detección de cepas resistentes mediante placas de cultivo con antibiótico y al estudio de subpoblaciones resistentes.

En definitiva, se trata de un modelo muy exigente, tanto en su ejecución como en la evaluación de sus resultados, que reproduce adecuadamente una infección de cuerpo extraño con un importante componente inflamatorio-purulento asociado, emulando las infecciones crónicas de prótesis articular.

2. Eficacia de diversos antibióticos como monoterapia de la infección experimental de cuerpo extraño. Correlación de los resultados *in vitro* – *in vivo*.

La actividad de los antibióticos fue evaluada *in vitro* en fase exponencial y estacionaria de crecimiento; mientras que los estudios en fase exponencial se encuentran bien estandarizados (76), los de fase estacionaria no tienen una metodología establecida así que optamos por utilizar un método ya descrito que nos permitió la reproducibilidad de esta fase y la expresión de tolerancia antibiótica (32). Con estos experimentos *in vitro* observamos la actividad bactericida en fase exponencial de todos los antibióticos a concentraciones clínicamente alcanzables excepto para linezolid, mientras que en fase estacionaria únicamente las fluoroquinolonas, levofloxacin y moxifloxacin, mostraron un efecto bactericida aunque necesitaron concentraciones mayores. Especialmente detallados fueron los estudios realizados con rifampicina en los que observamos que su actividad final se mostró claramente disminuida por la presencia de inóculos elevados y por el desarrollo de resistencias durante el estudio. Así, obtuvimos únicamente actividad bactericida en fase exponencial con inóculos ajustados a 5×10^5 UFC/ml, pero no en fase estacionaria con la metodología usada (con inóculos altos). Estos hallazgos fueron confirmados en estudios realizados con otras cepas de *S. aureus* en los que observamos resultados similares, que evidenciaron que se trataba de un efecto genérico y no particular con nuestra cepa de estudio.

En los estudios animales analizamos la eficacia *in vivo* de cloxacilina, vancomicina, linezolid, rifampicina, levofloxacino y moxifloxacino; las dosificaciones utilizadas en todos los casos fueron equivalentes a dosis convencionales en humanos. Para ambas fluoroquinolonas se reprodujeron además dosis altas; así, en el caso de levofloxacino fueron equivalentes a 500 mg/d y 750-1000 mg/d en humanos (recientemente recomendadas para el tratamiento de las infecciones de prótesis articular) y para moxifloxacino correspondieron a 400 mg/d y 800 mg/d. Levofloxacino a altas dosis fue el tratamiento más eficaz y ello se correlacionó con un parámetro farmacodinámico de $AUC/CMI = 234$, mucho mayor del obtenido con las dosis convencionales, $AUC/CMI = 136$. Moxifloxacino, que proporcionó mayores cocientes AUC/CMI que levofloxacino, no consiguió mejorar la eficacia tal como se comentará más adelante con mayor detenimiento. La importancia de esta gran actividad antiestafilocócica de levofloxacino a altas dosis se resalta al señalar que fue similar a la obtenida con rifampicina, considerado el antibiótico de referencia en la infección estafilocócica de prótesis articular. Por su parte, cloxacilina y vancomicina, los antibióticos bactericidas de referencia frente a *S. aureus* sensible y resistente a meticilina respectivamente, consiguieron una eficacia menor que rifampicina y levofloxacino a altas dosis. Estos resultados son acordes con lo conocido previamente y reflejan la menor eficacia de los antibióticos que actúan sobre la pared bacteriana de bacterias en división, en la infección de cuerpo extraño (8;30-32;58). Finalmente, linezolid, con los parámetros farmacodinámicos recomendados acordes con los obtenidos en humanos con la dosificación habitual, fue el tratamiento que mostró menor eficacia (86;87).

Precisamente por la relevancia de la dosificación de levofloxacino, las dosis seleccionadas en las ratas y sus equivalencias en humanos han sido analizadas con detenimiento. La mayoría de estudios de farmacocinética humana con levofloxacino se han llevado a cabo con la dosificación de 500 mg/d por lo que existen numerosos referentes y consideramos que los niveles de AUC alcanzados en nuestros experimentos con la dosis baja de levofloxacino son altamente concordantes (88-90). Por el contrario, los estudios en humanos sobre la farmacocinética de dosis de 750 mg-1000 mg/d son escasos (91;92). La pauta de altas dosis en nuestro modelo proporcionó unos niveles de $AUC = 117$, probablemente más próximos a los alcanzados con 1000

mg/d. En cualquier caso, asumiendo las limitaciones propias de los estudios experimentales consideramos que para alcanzar una alta eficacia antiestafilocócica con levofloxacino precisa de una dosis mayor de 500 mg/d, resultando más difícil una concreción sobre si ésta debería ser la equivalente a 750 mg/d o a la de 1000 mg/d. En este sentido, creemos que serían convenientes estudios de farmacocinética en humanos que perfilaran mejor los parámetros específicos para las dosis de 750 mg/d y de 1000 mg/d, y posteriormente definir las dosis en ratas que mejor se correspondan a cada una de ellas para analizar su eficacia comparativa. Igualmente es algo indefinida la recomendación existente para el tratamiento de la infección estafilocócica de prótesis articular que engloba conjuntamente la dosis 750-1000 mgs/d (3). Esta puntualización podría tener trascendencia clínica ya que algunos autores han alertado sobre los efectos secundarios de las dosis superiores a 750 mg/d (93).

Para prevenir el desarrollo de resistencias con el uso de fluoroquinolonas en solitario se recomiendan unos parámetros farmacodinámicos mínimos de seguridad ($C_{\max}/CMI > 8-10$) (94;95); recientemente, con el desarrollo del concepto de CPM se ha constatado que la aparición de cepas resistentes es máxima cuando las concentraciones del antibiótico se encuentran entre la CMI y la CPM (la denominada "Ventana de selección de mutantes", MSW), mientras que no aparecen cuando las concentraciones están por encima de la CPM (78;80;96;97). Clásicamente se ha considerado que en el curso del tratamiento de una infección por *S. aureus* con quinolonas en solitario existe un riesgo de desarrollo de resistencia; estos estudios han contemplado el uso de ciprofloxacino, pero el margen de seguridad que ofrecen las nuevas fluoroquinolonas parece ser mayor (57;94-97). Nuestros estudios apoyan el hecho de que, tanto por sus cocientes C_{\max}/CMI como por sus relaciones con la CPM (C_{\max}/CPM y AUC/CPM), la pauta con dosis elevadas de levofloxacino y las pautas de moxifloxacino en sus dos dosificaciones presentan un buen perfil de seguridad y en ellos no observamos la aparición de cepas resistentes. Nuestros estudios de resistencia fueron más completos con las bacterias recuperadas del grupo terapéutico de levofloxacino a altas dosis, en los que no se detectaron cambios en la CMI respecto de la cepa inicial ni en la evaluación de subpoblaciones resistentes.

Globalmente, cuando los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* en el modelo animal fueron comparados pudimos concluir que los estudios en fase estacionaria fueron los que mejor predecían la eficacia antibiótica *in vivo*, con la salvedad de rifampicina para quien los estudios *in vitro* en solitario fueron alterados por el efecto inóculo y el desarrollo de resistencias. Así, destacamos la estandarización de nuestros estudios en fase estacionaria ya que fueron reproducibles y se mostraron como un instrumento útil para explicar los resultados *in vivo* en la infección de cuerpo extraño. Todo ello aporta más evidencia sobre el hecho de la actividad antibiótica bactericida *in vitro* frente a bacterias en fase estacionaria como uno de los parámetros más relevantes de la eficacia de un antibiótico en la infección de prótesis articular (4;30-32).

Finalmente, la conclusión más destacable respecto a la eficacia de las diferentes monoterapias se refiere a levofloxacino a altas dosis ya que consideramos que los resultados obtenidos en los estudios *in vitro*, sus parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos, y los estudios de eficacia y seguridad frente a la aparición de resistencias *in vivo* aportan una clara evidencia de su gran actividad antiestafilocócica para su potencial uso en solitario en la infección de cuerpo extraño.

3. Eficacia de las nuevas fluoroquinolonas (levofloxacino y moxifloxacino) y su relación con los parámetros farmacodinámicos.

Los tratamientos con fluoroquinolonas, considerados antibióticos concentración dependientes, deben proporcionar un parámetro farmacodinámico AUC/CMI >125 y mejor ≥ 250 para garantizar su eficacia clínica y proteger del desarrollo de resistencias (98). Estas recomendaciones se establecieron en base a estudios realizados con ciprofloxacino frente a bacilos gram negativos, pero trabajos más recientes utilizando las nuevas fluoroquinolonas frente a *S. aureus* concluyeron que para alcanzar una eficacia similar este cociente varía en función de las diferentes quinolonas. En concreto para levofloxacino, el valor se cifró en un AUC/CMI de 115, parámetro no alcanzado con las dosis convencionales de 500 mg/d, pero sí asegurado con las dosis de 750-1000 mg/d; por su parte para moxifloxacino el valor mínimo requerido fue AUC/CMI de 75,

ampliamente alcanzado con las dosis convencionales (99). De acuerdo a estas predicciones, los resultados observados en nuestro modelo *in vivo* con levofloxacin a dosis convencionales (AUC/CMI de 136) y altas (AUC/CMI de 234) fueron concordantes y mostraron un incremento en la eficacia concentración dependiente y una gran actividad antiestafilocócica tal como se ha explicado anteriormente. Los parámetros proporcionados por moxifloxacin fueron muy superiores a los obtenidos con levofloxacin a dosis elevadas: a la dosis equivalente a la habitual de 400 mg/d en humanos con AUC/CMI de 431 y a dosis altas, equivalentes a 800 mg/d, AUC/CMI de 568. Con todo, los resultados de eficacia *in vivo* no guardaron una correlación con estos parámetros farmacodinámicos y no se evidenciaron diferencias significativas entre ambas fluoroquinolonas; incluso la cuantificación de bacterias erradicadas con levofloxacin a altas dosis fue mayor.

Globalmente, observamos una relación entre el incremento del cociente AUC/CMI y la eficacia de las fluoroquinolonas al evaluar las pautas con levofloxacin, pero no con moxifloxacin. Ello sugiere que el aumento de la eficacia de una fluoroquinolona directamente proporcional al incremento del cociente AUC/CMI se observó hasta un cierto punto en que se alcanzó una eficacia máxima. Ciertamente, puede ser cuestionable la aplicación de este criterio comparativo a experimentos realizados con dos quinolonas distintas ya que podrían no seguir una misma recta de relación cociente AUC/CMI-eficacia, aunque en este caso tampoco observamos un aumento proporcional de la actividad al comparar exclusivamente las dos dosificaciones de moxifloxacin entre sí, tal como habíamos visto con levofloxacin. La posible repercusión del efecto de distinta unión a proteínas de las dos quinolonas es improbable, ya que los diversos cocientes AUC/CMI comparados consideraron concentraciones de droga libre (no unida a proteínas). Otro aspecto a considerar sería la posibilidad de que estos hallazgos estuvieran relacionados con alguna característica intrínseca de moxifloxacin frente a *S. aureus*, pero los estudios previos y nuestros propios experimentos *in vitro*, refrendan la buena eficacia antiestafilocócica de moxifloxacin, similar a la de levofloxacin (100;101).

Nuestros datos apoyan pues la hipótesis de la existencia de un efecto máximo en la actividad de las fluoroquinolonas y que una vez alcanzado éste, no se conseguiría

mejorar la eficacia final con incrementos adicionales en los parámetros farmacodinámicos. La existencia de una concentración óptima bactericida (OBC, optimum bactericidal concentration) había sido descrito *in vitro* para el ácido nalidíxico y el ciprofloxacino; concentraciones mayores de esta OBC no alcanzan mayor actividad e incluso pueden producir un efecto paradójico con menor eficacia final (102-104). En concreto con levofloxacino y moxifloxacino, en estudios *in vitro* recientes que estudiaron su actividad con múltiples valores del cociente AUC/CMI para cada una de ellas, se predijo una eficacia similar con cocientes >100 dibujando unas gráficas dosis-respuesta de aspecto sigmoide para ambas (105). Otra evidencia *in vitro* de la posible máxima eficacia de estas fluoroquinolonas se encuentra en estudios de su actividad intracelular frente a *S. aureus* en los que también se describe una relación concentración-eficacia que sigue una curva de aspecto sigmoide, con un patrón de actividad concentración dependiente para aquellas concentraciones entre la CMI y la E_{max} (concentración que produce el efecto máximo) y un aspecto *plateau* a partir de esta E_{max} (43). Finalmente, en estudios de la farmacodinámica de diversas fluoroquinolonas *in vivo* en un modelo animal la relación entre la eficacia y el cociente AUC/CMI para diversas dosificaciones de la quinolona mostró también una gráfica de aspecto sigmoide a partir de AUC/CMI > 200 (73).

Por todo ello, sin poder excluir totalmente la existencia de algún factor intrínseco relacionado con la actividad de moxifloxacino, consideramos que nuestros resultados podrían reflejar esta relación de aspecto sigmoide de la actividad de las fluoroquinolonas, con un efecto máximo a partir del cual el aumento de dosis no proporciona mayor actividad.

4. Eficacia de la combinación levofloxacino-rifampicina en la infección experimental de cuerpo extraño por *S. aureus* meticilín sensible.

La actividad de esta combinación evaluada *in vitro* en fase exponencial mostró que rifampicina antagoniza el efecto bactericida de levofloxacino expresado a partir de su concentración CMB (2xCMI). En fase estacionaria también observamos que rifampicina produjo un descenso de la actividad de levofloxacino expresado igualmente a concentraciones mayores de su CMB (que en este caso era 8xCMI), mientras que con concentraciones menores el efecto de la combinación fue indiferente. La observación de un antagonismo entre rifampicina y fluoroquinolonas en los estudios *in vitro* en fase exponencial había sido descrita con la asociación de rifampicina y ciprofloxacino y ofloxacino (62;63;106); se consideró que la inhibición de la síntesis de ARN producida por rifampicina condiciona una disminución de la actividad bactericida de las quinolonas relacionada con el ADN (103;107). Por el contrario, la observación de antagonismo como resultado de la combinación en estudios en fase estacionaria no ha sido reportada previamente, y únicamente se había descrito un efecto de indiferencia con la asociación de ciprofloxacino y rifampicina en esta fase (64). En nuestros estudios, el antagonismo de rifampicina sobre levofloxacino y moxifloxacino se expresó también en fase estacionaria, si bien se puso en evidencia solo a partir de aquellas concentraciones de quinolona que producían un efecto bactericida mientras que en el rango de concentraciones entre su CMI y CMB en fase estacionaria se observaba un efecto de indiferencia similar al descrito con ciprofloxacino. Esta diferencia podría estar en gran parte relacionada con el mayor grado de actividad bactericida de las nuevas fluoroquinolonas sobre *S. aureus* en fase estacionaria.

Hasta el momento, la repercusión clínica del antagonismo *in vitro* de la combinación fluoroquinolona-rifampicina no ha sido nunca seriamente considerada. Mientras la asociación de ciprofloxacino o levofloxacino con rifampicina ha mostrado antagonismo en modelos animales de endocarditis (106;108), la terapia de combinación con ciprofloxacino ha resultado beneficiosa en el tratamiento de la endocarditis sobre válvula tricuspídea de los humanos (109). En el contexto de infecciones osteoarticulares

y de cuerpo extraño, la combinación de ciprofloxacino u ofloxacino con rifampicina está considerada como un tratamiento de elección basándose en los buenos resultados obtenidos tanto en estudios animales como en los escasos estudios clínicos realizados (56-58;60;75). Tras la reciente aparición de las nuevas fluoroquinolonas con mayor acción antiestafilocócica, se ha recomendado de una manera empírica la administración de levofloxacino 750-1000 mg/d junto a rifampicina en el tratamiento de la infección de prótesis articular, pero la información clínica que existe con esta combinación es escasa (3;65;66). En este contexto, los resultados proporcionados por nuestro trabajo experimental introducen un punto de reflexión potencialmente importante. En nuestros estudios animales la asociación de rifampicina con levofloxacino a dosis convencionales (C_{\max} 6 $\mu\text{g/ml}$) fue beneficiosa, mejorando la actividad de la quinolona en solitario, pero la combinación con altas dosis de levofloxacino (C_{\max} 12 $\mu\text{g/ml}$) disminuyó la eficacia de ésta. Respecto a la eficacia de las terapias de combinación con rifampicina, los resultados obtenidos fueron similares independientemente de la dosis de levofloxacino utilizada. Estos resultados *in vivo* también fueron acordes con los obtenidos *in vitro* en fase estacionaria donde rifampicina disminuyó la actividad de levofloxacino solo a concentraciones altas. La combinación de fluoroquinolona-rifampicina en el modelo experimental de infección de cuerpo extraño ha sido evaluada ampliamente con ciprofloxacino y ofloxacino y ha mostrado siempre una eficacia mayor que las monoterapias (31;32;58); por su parte, los efectos de la combinación levofloxacino-rifampicina utilizando dosis elevadas de levofloxacino no han sido estudiadas previamente. Recientemente, un grupo suizo de investigadores estudiaron la eficacia de la combinación en un modelo experimental de infección de cuerpo extraño, pero utilizando exclusivamente dosis muy bajas (C_{\max} 1,5 $\mu\text{g/ml}$; AUC/CMI 38), con lo que los resultados obtenidos fueron acordes a los nuestros con dosis convencionales de levofloxacino, obteniendo una eficacia comparable a la de rifampicina en solitario (110).

Rifampicina es un antibiótico que interfiere en el metabolismo de muchos otros fármacos por su acción sobre el citocromo P-450 hepático. En el caso concreto de las quinolonas, no parece que sus concentraciones se alteren de una forma significativa al asociarse con rifampicina, a pesar de que se ha comunicado puntualmente una

disminución de los niveles de moxifloxacino con esta combinación (111;112); hasta la fecha no existen datos publicados en ese mismo sentido con levofloxacino. En nuestros estudios experimentales pudimos comprobar que las concentraciones de levofloxacino no se veían modificadas significativamente por la asociación de rifampicina, por lo que la menor eficacia de la combinación no puede atribuirse a razones de interacción farmacocinética.

En cuanto al desarrollo de cepas resistentes a rifampicina, ambas dosis de levofloxacino mostraron su efecto protector y la eficacia final de las dos terapias de combinación fue similar. Ello podría sugerir que administrar una dosis alta de quinolonas no ofrece un efecto beneficioso añadido si se utiliza la combinación levofloxacino-rifampicina.

Finalmente, consideramos que los resultados de la eficacia clínica de la combinación fluoroquinolonas-rifampicina en el ámbito de la infección de prótesis articular deberían ser revaluados tras la incorporación de las nuevas quinolonas con gran actividad antiestafilocócica en fase estacionaria; la dosis más apropiada de levofloxacino en esta pauta de combinación así como la posible repercusión clínica del efecto antagónico de su asociación con rifampicina deberían ser consideradas.

5. Eficacia de linezolid en solitario y en combinación con rifampicina en la infección experimental de cuerpo extraño por *S. aureus* meticilín sensible.

En el momento de iniciarse el presente proyecto de investigación, linezolid era un antibiótico, ya comercializado, de reciente aparición que había sido evaluado principalmente frente a *S. aureus* con resistencia a meticilina (67). Sus características particulares podían ofrecer algunas ventajas en el ámbito de la infección de prótesis articular sobretodo por su biodisponibilidad oral, su difusión tisular y su espectro de actividad universal sobre estafilococos, por lo que consideramos oportuno su inclusión en el estudio de nuestro modelo de infección por *S. aureus* sensible a meticilina.

La actividad *in vitro* de linezolid en solitario mostró un efecto bacteriostático en fase exponencial y estacionaria con concentraciones clínicamente alcanzables, siendo

especialmente poco eficaz frente a bacterias en fase estacionaria. La asociación con rifampicina mostró indiferencia en ambas fases. Aunque no se estudió específicamente el efecto protector de linezolid frente al desarrollo de resistencia a rifampicina, en todos los estudios *in vitro* con esta combinación destacó la ausencia de recrecimiento bacteriano que sí se observaba con rifampicina en solitario por la rápida aparición de cepas resistentes. Nuestros resultados con linezolid solo y en combinación con rifampicina en fase exponencial fueron acordes a los ya publicados, mientras que los estudios en fase estacionaria resultaron más novedosos (113-115).

Tal y como se comentó anteriormente, linezolid en solitario mostró poca eficacia en los estudios animales en comparación con el resto de monoterapias de acuerdo a su actividad *in vitro* en fase estacionaria. La dosificación de linezolid en humanos está bien establecida y el uso de dosis mayores está limitado por la presencia de efectos secundarios; en este sentido consideramos que los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de linezolid conseguidos en nuestro estudio reprodujeron fielmente los que se obtienen en humanos para evitar representar dosificaciones más altas. Estudios de farmacodinámica de linezolid han sugerido un cociente AUC/CMI mínimo de 50-100 como predictor de buena eficacia clínica, y éste fue alcanzado con la dosificación utilizada en el presente trabajo (86;87). Con estas consideraciones, linezolid en solitario resultó ser el tratamiento menos eficaz, por lo que concluimos que su papel en monoterapia frente a *S. aureus* sensible a meticilina no sería relevante y que debería ser evaluado en el contexto de infecciones por *S. aureus* o estafilococos coagulasa negativos metilín resistentes donde existen menos alternativas terapéuticas. Respecto al desarrollo de resistencias, linezolid en solitario está considerado un fármaco con un buen perfil de seguridad y en nuestra experiencia no detectamos ninguna cepa resistente después del tratamiento prolongado.

La actividad de la combinación de linezolid con rifampicina fue evaluada comparativamente a la de cloxacilina-rifampicina mostrando una eficacia similar. El efecto más destacable de linezolid fue la protección frente al desarrollo de resistencias a rifampicina, hecho que pusimos en evidencia en nuestros estudios prolongando la duración del tratamiento. Mientras el desarrollo de resistencia a rifampicina no repercutió de una forma evidente en su grado de eficacia como monoterapia en las

pautas de tratamiento de 7 días, ello sí ocurrió en las pautas de 10 días, en las que se observó un recrecimiento de cepas resistentes a rifampicina y una total ineficacia. La protección en el desarrollo de cepas resistentes a rifampicina con la combinación linezolid-rifampicina no se acompañó de un aumento de eficacia en las pautas de 7 días, pero este efecto fue muy evidente en las pautas de 10 días. Unos resultados acordes a los nuestros, con linezolid en solitario y con rifampicina, han sido recientemente publicados por Baldoni et al. utilizando un modelo animal de infección de cuerpo extraño por *S. aureus* meticilín resistente (116).

Teniendo en cuenta el papel principal de rifampicina y sus efectos beneficiosos en la infección estafilocócica de prótesis articular, consideramos que linezolid podría ser una alternativa como antibiótico de combinación para impedir el desarrollo de resistencias a rifampicina. La eficacia de linezolid-rifampicina en comparación con otras terapias de combinación debería ser convenientemente evaluada en las situaciones de estafilococos meticilín resistentes.

CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

1. Respecto al desarrollo y estandarización del modelo de infección de cuerpo extraño en ratas:
 - 1a. El modelo reproduce adecuadamente las características principales de una infección de prótesis articular: tolerancia bacteriana a los antibióticos, formación de biofilm y alteraciones funcionales de las células fagocíticas.
 - 1b. Se muestra adecuado para valorar la eficacia de la antibioterapia frente a una infección de cuerpo extraño con un importante componente inflamatorio, emulando a una infección crónica de prótesis articular.
 - 1c. Sin embargo su costosa ejecución y su grado de exigencia para objetivar las diferencias de eficacia entre las diversas pautas terapéuticas pueden considerarse factores limitantes.
 - 1d. El hallazgo de un elevado componente de bacterias de localización intracelular sugiere que el nivel de actividad antibiótica intracelular es un factor limitante en la eficacia final de una pauta terapéutica determinada.

2. Respecto a la evaluación de la eficacia antibiótica de las monoterapias:
 - 2a. Los estudios *in vitro* realizados con bacterias en fase estacionaria de crecimiento son los que aportan mayor información sobre la eficacia de los antibióticos frente a una infección de cuerpo extraño.
 - 2b. Levofloxacino a altas dosis mostró gran actividad *in vitro* frente a bacterias en fase exponencial y estacionaria y fue el tratamiento más eficaz y seguro en el modelo *in vivo*, con una actividad similar o superior a la de rifampicina, que confirmó su buena eficacia a pesar del desarrollo de resistencias.

- 2c. Estos resultados permiten considerar el uso de levofloxacino en solitario a la dosis de 750-1000 mg/d en humanos como una potencial alternativa para la infección estafilocócica de prótesis articular. Para ello debería definirse mejor el perfil farmacocinético de estas dosis elevadas y de sus posibles efectos secundarios.

3. Respecto de la eficacia de las fluoroquinolonas y sus parámetros farmacodinámicos:
 - 3a. Los estudios de farmacodinámica de las nuevas fluoroquinolonas con gran actividad antiestafilocócica sugieren la existencia de una eficacia máxima a partir de la cual al aumentar la dosis no se consigue un mayor efecto.
 - 3b. Nuestros resultados no sugieren que moxifloxacino proporcione ventajas significativas respecto a levofloxacino a dosis elevadas en el tratamiento de la infección estafilococia de prótesis articular.

4. Respecto a la eficacia de la combinación rifampicina-levofloxacino:
 - 4a. Rifampicina produce un efecto de antagonismo al combinarse con levofloxacino a altas dosis, tanto *in vitro* como en el modelo *in vivo*.
 - 4b. Las pautas de rifampicina en monoterapia, rifampicina-levofloxacino a dosis convencionales y rifampicina-levofloxacino a dosis altas mostraron una eficacia similar, si bien las combinaciones con levofloxacino tuvieron un efecto protector en el desarrollo de resistencias a rifampicina.
 - 4c. La monoterapia con levofloxacino a dosis altas fue significativamente más eficaz que la combinación de rifampicina-levofloxacino a dosis altas.

- 4d. Nuestros resultados ponen en cuestión la necesidad de utilizar dosis de 750mg/d de levofloxacin, en las pautas de rifampicina y fluoroquinolonas actualmente recomendadas para el tratamiento de la infección estafilocócica de prótesis articular.
 - 4e. La importancia clínica del antagonismo de la combinación rifampicina-levofloxacin a dosis elevados debería ser evaluado en la infección estafilocócica de prótesis articular.
5. Respecto a la eficacia de linezolid:
- 5a. La actividad de linezolid en solitario en la infección de cuerpo extraño por *S. aureus* metilín sensible no es relevante, mientras que su combinación con rifampicina permite ofrecer el efecto protector frente al desarrollo de resistencias.

BIBLIOGRAFÍA

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Steckelberg, JM, Osmon DR. Prosthetic joint infections, p. 173-209. En: Waldvogel FA, Bisno AL, (ed.). Infections associated with indwelling medical devices, 3rd edition, Washington: ASM Press; 2000.
- (2) Tsukayama DT, Estrada R, Gustilo RB. Infection after total hip arthroplasty. A study of the treatment of one hundred and six infections. *J Bone Joint Surg Am.* 1996;78:512-23.
- (3) Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med.* 2004;351:1645-54.
- (4) Ariza J, Euba G, Murillo O. [Orthopedic device-related infections]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26:380-390.
- (5) Berbari EF, Hanssen AD, Duffy MC, Steckelberg JM, Ilstrup DM, Harmsen WS et al. Risk factors for prosthetic joint infection: case-control study. *Clin Infect Dis.* 1998;27:1247-54.
- (6) Berbari EF, Osmon DR, Duffy MC, Harmsen RN, Mandrekar JN, Hanssen AD et al. Outcome of prosthetic joint infection in patients with rheumatoid arthritis: the impact of medical and surgical therapy in 200 episodes. *Clin Infect Dis.* 2006;42:216-23.
- (7) Lentino JR. Prosthetic joint infections: bane of orthopedists, challenge for infectious disease specialists. *Clin Infect Dis.* 2003;36:1157-61.
- (8) Chuard C, Lucet JC, Rohner P, Herrmann M, Auckenthaler R, Waldvogel FA et al. Resistance of *Staphylococcus aureus* recovered from infected foreign body in vivo to killing by antimicrobials. *J Infect Dis.* 1991;163:1369-73.
- (9) Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999;284:1318-22.
- (10) Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* 2001;358:135-38.
- (11) Segawa H, Tsukayama DT, Kyle RF, Becker DA, Gustilo RB. Infection after total knee arthroplasty. A retrospective study of the treatment of eighty-one infections. *J Bone Joint Surg Am.* 1999;81:1434-45.
- (12) Atkins BL, Athanasou N, Deeks JJ, Crook DW, Simpson H, Peto TE et al. Prospective evaluation of criteria for microbiological diagnosis of prosthetic-

- joint infection at revision arthroplasty. The OSIRIS Collaborative Study Group. *J Clin Microbiol.* 1998;36:2932-39.
- (13) McDowell A, Patrick S. Evaluation of nonculture methods for the detection of prosthetic hip biofilms. *Clin Orthop Relat Res.* 2005;74-82.
- (14) Spangehl MJ, Masri BA, O'Connell JX, Duncan CP. Prospective analysis of preoperative and intraoperative investigations for the diagnosis of infection at the sites of two hundred and two revision total hip arthroplasties. *J Bone Joint Surg Am.* 1999;81:672-83.
- (15) Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med.* 2007;357:654-63.
- (16) Bernard L, Hoffmeyer P, Assal M, Vaudaux P, Schrenzel J, Lew D. Trends in the treatment of orthopaedic prosthetic infections. *J Antimicrob Chemother.* 2004;53:127-29.
- (17) Marculescu CE, Berbari EF, Hanssen AD, Steckelberg JM, Harmsen SW, Mandrekar JN et al. Outcome of prosthetic joint infections treated with debridement and retention of components. *Clin Infect Dis.* 2006;42:471-78.
- (18) Hanssen AD, Spangehl MJ. Treatment of the infected hip replacement. *Clin Orthop Relat Res.* 2004;63-71.
- (19) Saleh K, Callaghan J, Gioe T, Gross A, Holtzman J, Krackow K et al. Septic joint replacement: an orthopedic perspective. *Clin Infect Dis.* 2002;34:868-70.
- (20) Sendi P, Rohrbach M, Graber P, Frei R, Ochsner PE, Zimmerli W. *Staphylococcus aureus* small colony variants in prosthetic joint infection. *Clin Infect Dis.* 2006;43:961-67.
- (21) Gresham HD, Lowrance JH, Caver TE, Wilson BS, Cheung AL, Lindberg FP. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J Immunol.* 2000;164:3713-22.
- (22) Zimmerli W, Lew PD, Waldvogel FA. Pathogenesis of foreign body infection. Evidence for a local granulocyte defect. *J Clin Invest.* 1984;73:1191-200.
- (23) Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol.* 1994;176:2137-42.
- (24) Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:999-1007.

- (25) Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol.* 1994;176:269-75.
- (26) Kong KF, Vuong C, Otto M. Staphylococcus quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int J Med Microbiol.* 2006;296:133-39.
- (27) Reading NC, Sperandio V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;254:1-11.
- (28) Anwar H, Dasgupta MK, Costerton JW. Testing the susceptibility of bacteria in biofilms to antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34:2043-46.
- (29) Gilbert P, Collier PJ, Brown MR. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34:1865-68.
- (30) Blaser J, Vergeres P, Widmer AF, Zimmerli W. In vivo verification of in vitro model of antibiotic treatment of device-related infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:1134-39.
- (31) Widmer AF, Frei R, Rajacic Z, Zimmerli W. Correlation between in vivo and in vitro efficacy of antimicrobial agents against foreign body infections. *J Infect Dis.* 1990;162:96-102.
- (32) Zimmerli W, Frei R, Widmer AF, Rajacic Z. Microbiological tests to predict treatment outcome in experimental device-related infections due to *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 1994;33:959-67.
- (33) Proctor RA, Kahl B, von EC, Vaudaux PE, Lew DP, Peters G. Staphylococcal small colony variants have novel mechanisms for antibiotic resistance. *Clin Infect Dis.* 1998;27 Suppl 1:S68-S74.
- (34) Proctor RA, von EC, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4:295-305.
- (35) Vaudaux P, Kelley WL, Lew DP. *Staphylococcus aureus* small colony variants: difficult to diagnose and difficult to treat. *Clin Infect Dis.* 2006;43:968-70.
- (36) Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5:48-56.
- (37) Keren I, Kaldalu N, Spoering A, Wang Y, Lewis K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol Lett.* 2004;230:13-18.

- (38) Lewis K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Mosc)*. 2005;70:267-74.
- (39) Zimmerli W, Waldvogel FA, Vaudaux P, Nydegger UE. Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model. *J Infect Dis*. 1982;146:487-97.
- (40) Maurin M, Raoult D. Intracellular organisms. *Int J Antimicrob Agents*. 1997;9:61-70.
- (41) Rogers D, Tompsett R. The survival of staphylococci within human leukocytes. *J Exp Med*. 1952;95:209-30.
- (42) Ellington JK, Harris M, Hudson MC, Vishin S, Webb LX, Sherertz R. Intracellular *Staphylococcus aureus* and antibiotic resistance: implications for treatment of staphylococcal osteomyelitis. *J Orthop Res*. 2006;24:87-93.
- (43) Barcia-Macay M, Seral C, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM, Van BF. Pharmacodynamic evaluation of the intracellular activities of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a model of THP-1 macrophages. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:841-51.
- (44) Carryn S, Chanteux H, Seral C, Mingeot-Leclercq MP, Van BF, Tulkens PM. Intracellular pharmacodynamics of antibiotics. *Infect Dis Clin North Am*. 2003;17:615-34.
- (45) Maurin M, Raoult D. Optimum treatment of intracellular infection. *Drugs*. 1996;52:45-59.
- (46) Proctor RA, Balwit JM, Vesga O. Variant subpopulations of *Staphylococcus aureus* as cause of persistent and recurrent infections. *Infect Agents Dis*. 1994;3:302-12.
- (47) Brady RA, Leid JG, Camper AK, Costerton JW, Shirtliff ME. Identification of *Staphylococcus aureus* proteins recognized by the antibody-mediated immune response to a biofilm infection. *Infect Immun*. 2006;74:3415-26.
- (48) Waldvogel, F. A. *Staphylococcus aureus* (including toxic shock syndrome), p. 2513-2539. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (ed.), *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 5th edition, Churchill Livingstone, New York, USA, 2000.
- (49) Novick RP, *Staphylococci*, p. 519-530. En: Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS (ed.), *Mycrobiology*, 4th edition, J.B. Lippincot Company, Philadelphia, USA, 1996.

- (50) Chambers HF. Pathogenesis of staphylococcal infection: a manner of expression. *J Infect Dis.* 2009;199:291-93.
- (51) Bayles KW, Wesson CA, Liou LE, Fox LK, Bohach GA, Trumble WR. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun.* 1998;66:336-42.
- (52) Kiran MD, Giacometti A, Cirioni O, Balaban N. Suppression of biofilm related, device-associated infections by staphylococcal quorum sensing inhibitors. *Int J Artif Organs.* 2008;31:761-70.
- (53) Balaban N, Cirioni O, Giacometti A, Ghiselli R, Braunstein JB, Silvestri C et al. Treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm infection by the quorum-sensing inhibitor RIP. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:2226-29.
- (54) Balaban N, Giacometti A, Cirioni O, Gov Y, Ghiselli R, Mocchegiani F et al. Use of the quorum-sensing inhibitor RNAIII-inhibiting peptide to prevent biofilm formation in vivo by drug-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis.* 2003;187:625-30.
- (55) Murdoch DR, Roberts SA, Fowler JV, Jr., Shah MA, Taylor SL, Morris AJ et al. Infection of orthopedic prostheses after *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis.* 2001;32:647-49.
- (56) Drancourt M, Stein A, Argenson JN, Zannier A, Curvale G, Raoult D. Oral rifampin plus ofloxacin for treatment of *Staphylococcus*-infected orthopedic implants. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37:1214-18.
- (57) Zimmerli W, Widmer AF, Blatter M, Frei R, Ochsner PE. Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: a randomized controlled trial. Foreign-Body Infection (FBI) Study Group. *JAMA.* 1998;279:1537-41.
- (58) Chuard C, Herrmann M, Vaudaux P, Waldvogel FA, Lew DP. Successful therapy of experimental chronic foreign-body infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antimicrobial combinations. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35:2611-16.
- (59) Drancourt M, Stein A, Argenson JN, Roiron R, Groulier P, Raoult D. Oral treatment of *Staphylococcus* spp. infected orthopaedic implants with fusidic acid or ofloxacin in combination with rifampicin. *J Antimicrob Chemother.* 1997;39:235-40.
- (60) Lucet JC, Herrmann M, Rohner P, Auckenthaler R, Waldvogel FA, Lew DP. Treatment of experimental foreign body infection caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34:2312-17.

- (61) Vaudaux P, Francois P, Bisognano C, Schrenzel J, Lew DP. Comparison of levofloxacin, alatrofloxacin, and vancomycin for prophylaxis and treatment of experimental foreign-body-associated infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:1503-9.
- (62) Hackbarth CJ, Chambers HF, Sande MA. Serum bactericidal activity of rifampin in combination with other antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1986;29:611-13.
- (63) Kang SL, Rybak MJ, McGrath BJ, Kaatz GW, Seo SM. Pharmacodynamics of levofloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin, alone and in combination with rifampin, against methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* in an in vitro infection model. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38:2702-9.
- (64) Bahl D, Miller DA, Leviton I, Gialanella P, Wolin MJ, Liu W et al. In vitro activities of ciprofloxacin and rifampin alone and in combination against growing and nongrowing strains of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41:1293-97.
- (65) Barberan J, Aguilar L, Carroquino G, Gimenez MJ, Sanchez B, Martinez D et al. Conservative treatment of staphylococcal prosthetic joint infections in elderly patients. *Am J Med*. 2006;119:993-10.
- (66) Soriano A, Garcia S, Bori G, Almela M, Gallart X, Macule F et al. Treatment of acute post-surgical infection of joint arthroplasty. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12:930-933.
- (67) Chien JW, Kucia ML, Salata RA. Use of linezolid, an oxazolidinone, in the treatment of multidrug-resistant gram-positive bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 2000;30:146-51.
- (68) Bassetti M, Di BA, Cenderello G, Del B, V, Palermo A, Cruciani M et al. Linezolid treatment of prosthetic hip Infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Infect*. 2001;43:148-49.
- (69) Jover-Saenz A, Gaité FB, Ribelles AG, Porcel-Perez JM, Garrido-Calvo S. Linezolid treatment of total prosthetic knee infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect*. 2003;47:87-88.
- (70) Zak O, Sande M, O'Reilly T. Introduction: The role of animal models in the evaluation of new antibiotics, p.xxi-xxiv. En: Zak O, Sande MA (ed.). *Handbook of animal models of infection*. Academic Press, London, UK, 1999.
- (71) Zak O, O'Reilly T. Animal models as predictors of the safety and efficacy of antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1990;9:472-78.

- (72) Zak O, O'Reilly T. Animal infection models and ethics--the perfect infection model. *J Antimicrob Chemother.* 1993;31 Suppl D:193-205.
- (73) Andes D, Craig WA. Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review. *Int J Antimicrob Agents.* 2002;19:261-68.
- (74) Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis.* 1998;26:1-10.
- (75) Widmer AF, Gaechter A, Ochsner PE, Zimmerli W. Antimicrobial treatment of orthopedic implant-related infections with rifampin combinations. *Clin Infect Dis.* 1992;14:1251-53.
- (76) Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically-Sixth Edition: Approved Standard M7-A6.* CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA. 2005.
- (77) National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. M26-A.* NCCLS, Villanova, PA, USA. 1999.
- (78) Drlica K, Zhao X. Mutant selection window hypothesis updated. *Clin Infect Dis.* 2007;44:681-88.
- (79) Zhao X, Drlica K. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants: a general strategy derived from fluoroquinolone studies. *Clin Infect Dis.* 2001;33 Suppl 3:S147-S156.
- (80) Zhao X, Drlica K. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutant bacteria: measurement and potential use of the mutant selection window. *J Infect Dis.* 2002;185:561-65.
- (81) Chapin-Robertson K, Edberg SC. Measurements of antibiotics in human body fluids: techniques and significance. In: Lorian V (ed.): *Antibiotics in laboratory medicine.* New York: Williams and Wilkins, pp 295-366. 1991.
- (82) Ryan DM, Hodges B, Spencer GR, Harding SM. Simultaneous comparison of three methods for assessing ceftazidime penetration into extravascular fluid. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982;22:995-98.
- (83) Trampuz A, Wenk M, Rajacic Z, Zimmerli W. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of levofloxacin against *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in human skin blister fluid. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:1352-55.

- (84) Vogelmann B, Gudmundsson S, Leggett J, Turnidge J, Ebert S, Craig WA. Correlation of antimicrobial pharmacokinetic parameters with therapeutic efficacy in an animal model. *J Infect Dis.* 1988;158:831-47.
- (85) Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet.* 1997;350:1670-1673.
- (86) Andes D, van Ogtrop ML, Peng J, Craig WA. In vivo pharmacodynamics of a new oxazolidinone (linezolid). *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:3484-89.
- (87) MacGowan AP. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of linezolid in healthy volunteers and patients with Gram-positive infections. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51 Suppl 2:ii17-ii25.
- (88) Chien SC, Rogge MC, Gisclon LG, Curtin C, Wong F, Natarajan J et al. Pharmacokinetic profile of levofloxacin following once-daily 500-milligram oral or intravenous doses. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:2256-60.
- (89) Preston SL, Drusano GL, Berman AL, Fowler CL, Chow AT, Dornseif B et al. Pharmacodynamics of levofloxacin: a new paradigm for early clinical trials. *JAMA.* 1998;279:125-29.
- (90) Wagenlehner FM, Kinzig-Schippers M, Sorgel F, Weidner W, Naber KG. Concentrations in plasma, urinary excretion and bactericidal activity of levofloxacin (500 mg) versus ciprofloxacin (500 mg) in healthy volunteers receiving a single oral dose. *Int J Antimicrob Agents.* 2006;28:551-59.
- (91) Chien SC, Wong FA, Fowler CL, Callery-D'Amico SV, Williams RR, Nayak R et al. Double-blind evaluation of the safety and pharmacokinetics of multiple oral once-daily 750-milligram and 1-gram doses of levofloxacin in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:885-88.
- (92) Chow AT, Fowler C, Williams RR, Morgan N, Kaminski S, Natarajan J. Safety and pharmacokinetics of multiple 750-milligram doses of intravenous levofloxacin in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:2122-25.
- (93) Senneville E, Poissy J, Legout L, Dehecq C, Loiez C, Valette M et al. Safety of prolonged high-dose levofloxacin therapy for bone infections. *J Chemother.* 2007;19:688-93.
- (94) Thomas JK, Forrest A, Bhavnani SM, Hyatt JM, Cheng A, Ballow CH et al. Pharmacodynamic evaluation of factors associated with the development of bacterial resistance in acutely ill patients during therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:521-27.

- (95) Craig WA. Does the dose matter? *Clin Infect Dis*. 2001;33 Suppl 3:S233-S237.
- (96) Cui J, Liu Y, Wang R, Tong W, Drlica K, Zhao X. The mutant selection window in rabbits infected with *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*. 2006;194:1601-8.
- (97) Firsov AA, Vostrov SN, Lubenko IY, Drlica K, Portnoy YA, Zinner SH. In vitro pharmacodynamic evaluation of the mutant selection window hypothesis using four fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:1604-13.
- (98) Forrest A, Nix DE, Ballow CH, Goss TF, Birmingham MC, Schentag JJ. Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37:1073-81.
- (99) Firsov AA, Lubenko IY, Vostrov SN, Portnoy YA, Zinner SH. Antistaphylococcal effect related to the area under the curve/MIC ratio in an in vitro dynamic model: predicted breakpoints versus clinically achievable values for seven fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:2642-47.
- (100) Bauernfeind A. Comparison of the antibacterial activities of the quinolones Bay 12-8039, gatifloxacin (AM 1155), trovafloxacin, clinafloxacin, levofloxacin and ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother*. 1997;40:639-51.
- (101) Lister PD. Pharmacodynamics of moxifloxacin and levofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in an in vitro pharmacodynamic model. *Clin Infect Dis*. 2001;32 Suppl 1:S33-S38.
- (102) Crumplin GC, Smith JT. Nalidixic acid: an antibacterial paradox. *Antimicrob Agents Chemother*. 1975;8:251-61.
- (103) Lewin CS, Morrissey I, Smith JT. The mode of action of quinolones: the paradox in activity of low and high concentrations and activity in the anaerobic environment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1991;10:240-248.
- (104) Piddock LJ. New quinolones and gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38:163-69.
- (105) Firsov AA, Zinner SH, Vostrov SN, Portnoy YA, Lubenko IY. AUC/MIC relationships to different endpoints of the antimicrobial effect: multiple-dose in vitro simulations with moxifloxacin and levofloxacin. *J Antimicrob Chemother*. 2002;50:533-39.
- (106) Kaatz GW, Seo SM, Barriere SL, Albrecht LM, Rybak MJ. Ciprofloxacin and rifampin, alone and in combination, for therapy of experimental

- Staphylococcus aureus endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33:1184-87.
- (107) Lewin CS, Smith JT. Bactericidal mechanisms of ofloxacin. *J Antimicrob Chemother.* 1988;22 Suppl C:1-8.
- (108) Chambers HF, Xiang Q, Liu, Chow LL, Hackbarth C. Efficacy of levofloxacin for experimental aortic-valve endocarditis in rabbits infected with viridans group streptococcus or Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:2742-46.
- (109) Dworkin RJ, Lee BL, Sande MA, Chambers HF. Treatment of right-sided Staphylococcus aureus endocarditis in intravenous drug users with ciprofloxacin and rifampicin. *Lancet.* 1989;2:1071-73.
- (110) Trampuz A, Murphy CK, Rothstein DM, Widmer AF, Landmann R, Zimmerli W. Efficacy of a novel rifamycin derivative, ABI-0043, against Staphylococcus aureus in an experimental model of foreign-body infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:2540-2545.
- (111) Nijland HM, Ruslami R, Suroto AJ, Burger DM, Alisjahbana B, van CR et al. Rifampicin reduces plasma concentrations of moxifloxacin in patients with tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 2007;45:1001-7.
- (112) Temple ME, Nahata MC. Interaction between ciprofloxacin and rifampin. *Ann Pharmacother.* 1999;33:868-70.
- (113) Grohs P, Kitzis MD, Gutmann L. In vitro bactericidal activities of linezolid in combination with vancomycin, gentamicin, ciprofloxacin, fusidic acid, and rifampin against Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:418-20.
- (114) Jacqueline C, Caillon J, Le M, V, Miegerville AF, Donnio PY, Bugnon D et al. In vitro activity of linezolid alone and in combination with gentamicin, vancomycin or rifampicin against methicillin-resistant Staphylococcus aureus by time-kill curve methods. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51:857-64.
- (115) Soriano A, Jurado A, Marco F, Almela M, Ortega M, Mensa J. [In vitro activity of linezolid, moxifloxacin, levofloxacin, clindamycin and rifampin, alone and in combination, against Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis.]. *Rev Esp Quimioter.* 2005;18:168-72.
- (116) Baldoni D, Haschke M, Rajacic Z, Zimmerli W, Trampuz A. Linezolid alone or combined with rifampin against methicillin-resistant Staphylococcus aureus in experimental foreign-body infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:1142-48.

