

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO *IN VITRO* Y EXPERIMENTAL DE LA EFICACIA DE  
OFLOXACINO FRENTE A MICROORGANISMOS HABITUALES  
RESPONSABLES DE LA ÚLCERA CORNEAL

TESIS DOCTORAL

M<sup>a</sup> Araceli LOSCOS FERNÁNDEZ

Madrid, 1996



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

28040 MADRID

D. José PRIETO PRIETO, Catedrático de Microbiología y Parasitología y D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Luisa GÓMEZ-LUS CENTELLES, Profesora Titular. Departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

**Certifican:**

Que el trabajo de investigación titulado: ESTUDIO *IN VITRO* Y EXPERIMENTAL DE LA EFICACIA DE OFLOXACINO FRENTE A MICROORGANISMOS HABITUALES RESPONSABLES DE LA ÚLCERA CORNEAL, constituye la memoria presentada por D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Araceli Loscos Fernández, Licenciada en Medicina y Cirugía para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía, y ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste a los efectos oportunos firmamos la presente en Madrid, a 12 de marzo de mil novecientos noventa y seis.

Fdo. José PRIETO PRIETO  
Director

Fdo. M<sup>a</sup> L. GÓMEZ-LUS CENTELLES  
Codirectora

A Carmen

## AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Dr. D. José Prieto Prieto por su acogida en el Departamento de Microbiología, por sus enseñanzas e interés en mi formación científica, por su ayuda incondicional para la elaboración de esta Tesis.

A la Dra. D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Luisa Gómez-Lus Centelles por su dirección y revisión continua, por sus orientaciones precisas y claridad de ideas.

A la Dra. D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> del Carmen Ramos Tejera, gracias a la cual se ha podido realizar el estudio del EPA, en elogio de su labor y amabilidad.

A mis amigas y compañeras durante todos estos años, las Dras. D<sup>a</sup> Sagrario Heredia y D<sup>a</sup> Paola Pérez, a D<sup>a</sup> Adelaida Dominguez, por su excepcional trabajo prestado en el desarrollo y mantenimiento de esta investigación, con mi admiración y respeto.

Al Departamento de Oftalmología de la Fundación Jimenez Díaz dirigido por el Dr. D. M.A. Zato Gómez de Liaño, y en particular a los médicos D. José Luis Bueno, D. César Pérez y D. Fernando Santamaría por su colaboración.

A todos los que trabajan o han trabajado en este Departamento, por su ayuda incondicional en diversos momentos, por apagar los "fuegos", por abusar de ellos constantemente, por su estímulo y constancia. A Pedro Bas por su trabajo y colaboración como Técnico de Laboratorio, a la Sra. Antonia que nos acondicionó y preparó el animalario y a Pedro Barquero que nos resolvió todos los "papeles".

A Maribel Llorente de Laboratorios Rhône Poulenc Rorer, SA, a Félix Andradas de Laboratorios Knoll, SA y a Luis Cejudo de Laboratorios Zambón, SA, por su inestimable ayuda en las tareas de búsqueda bibliográfica.

A D. Francisco Javier Loscos y a D. Fernando Valtueña por sus consejos de redacción, por su lectura atenta.

A D. Ignacio Loscos por su ayuda a mesa de ordenador, a él se debe todo este trabajo de diseño y asistencia informática, también a D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Jesús Loscos y D. Juan José Loscos por su trabajo en el diseño de las figuras.

A mis padres, a mis hermanos y a mis compañeros de trabajo en el Centro de Salud, que durante todos estos años han confiado, alentado y seguido de cerca mi trabajo, por su cariño y respeto.

A todos ellos dirijo mi agradecimiento, por su disponibilidad y paciencia diaria.

Madrid, Marzo de 1996

M<sup>a</sup> Araceli LOSCOS FERNÁNDEZ

## **ÍNDICE**

---

<b>ABREVIATURAS</b> .....	XVII
<b>I.- <u>INTRODUCCIÓN</u></b> .....	1
1. LA ÚLCERA CORNEAL BACTERIANA .....	5
2. ANTIMICROBIANOS .....	25
3. EFECTO POSTANTIBIÓTICO .....	51
4. FARMACOCINÉTICA OCULAR .....	59
<b>II.- <u>OBJETIVOS</u></b> .....	68
<b>III.- <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u></b> .....	70
1. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> .....	71
2. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i> .....	77
<b>IV. <u>RESULTADOS</u></b> .....	86
1. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> .....	87
2. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS <i>IN VIVO</i> .....	104

<b>V. <u>DISCUSIÓN</u></b> .....	118
1. <b>EVALUACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL</b> .....	120
2. <b>DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS <i>IN VITRO</i></b> .....	146
3. <b>DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS <i>IN VIVO</i></b> .....	154
4. <b>SIGNIFICADO BIOLÓGICO DEL EPA Y SU INFLUENCIA EN LA DOSIFICACIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS EN UN ENSAYO EXPERIMENTAL</b> .....	166
<b>VI. <u>CONCLUSIONES</u></b> .....	173
<b>VII. <u>BIBLIOGRAFÍA</u></b> .....	176
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	226
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	229

---

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>XVII</b>
<b>I.- <u>INTRODUCCIÓN</u></b> .....	<b>1</b>
<b>1. LA ÚLCERA CORNEAL BACTERIANA</b> .....	<b>5</b>
1.1. DEFINICIÓN .....	5
1.2. ETIOLOGÍA .....	5
1.3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL .....	6
1.3.1. Infecciones bacterianas .....	6
1.3.2. Queratopatías tróficas .....	7
1.3.3. Queratopatías tóxicas .....	8
1.3.4. Queratitis traumáticas .....	8
1.3.5. Infecciones víricas .....	8
1.3.6. Infecciones por hongos .....	8
1.3.7. Queratitis por parásitos .....	9
1.4. PATOGENIA .....	9
1.5. ANATOMÍA PATOLÓGICA .....	13
1.6. CLÍNICA .....	14
1.7. FORMAS CLÍNICAS DE PRESENTACIÓN .....	15
1.7.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	15
1.7.2. Especies de <i>Staphylococcus</i> .....	16
1.7.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	17
1.7.4. <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	18
1.7.5. Especies de <i>Moraxella</i> .....	19
1.7.6. <i>Enterobacteriaceae</i> .....	19
1.7.7. Especies de <i>Bacillus</i> .....	20
1.8. DIAGNÓSTICO .....	21
1.9. TRATAMIENTO .....	23

---

<b>2. ANTIMICROBIANOS</b> .....	25
<b>2.1. OFLOXACINO</b> .....	25
2.1.1. Estructura química .....	25
2.1.2. Propiedades fisico-químicas .....	25
2.1.3. Mecanismo de acción .....	26
2.1.4. Actividad antimicrobiana .....	27
2.1.5. Desarrollo de resistencias .....	28
2.1.6. Indicaciones clínicas .....	29
2.1.7. Farmacología ocular .....	30
2.1.8. Interacciones bacteriológicas .....	32
2.1.9. Toxicidad y efectos secundarios .....	32
2.1.10. Contraindicaciones .....	32
<b>2.2. TIAMFENICOL</b> .....	33
2.2.1. Estructura química .....	33
2.2.2. Propiedades fisico-químicas .....	33
2.2.3. Mecanismo de acción .....	34
2.2.4. Actividad antimicrobiana .....	34
2.2.5. Desarrollo de resistencias .....	35
2.2.6. Indicaciones clínicas .....	35
2.2.7. Farmacología ocular .....	35
2.2.8. Interacciones bacteriológicas .....	37
2.2.9. Toxicidad y efectos secundarios .....	37
2.2.10. Contraindicaciones .....	37
<b>2.3. RIFAMPICINA</b> .....	38
2.3.1. Estructura química .....	38
2.3.2. Propiedades fisico-químicas .....	39
2.3.3. Mecanismo de acción .....	39
2.3.4. Actividad antimicrobiana .....	39
2.3.5. Desarrollo de resistencias .....	40
2.3.6. Indicaciones clínicas .....	41

---

2.3.7. Farmacología ocular .....	41
2.3.8. Interacciones bacteriológicas .....	42
2.3.9. Toxicidad y efectos secundarios .....	42
2.3.10. Contraindicaciones .....	42
<b>2.4. AMINOGLUCÓSIDOS: GENTAMICINA - TOBRAMICINA .....</b>	<b>43</b>
2.4.1. Estructura química .....	43
2.4.2. Propiedades físico-químicas .....	44
2.4.3. Mecanismo de acción .....	44
2.4.4. Actividad antimicrobiana .....	45
2.4.5. Desarrollo de resistencias .....	46
2.4.6. Indicaciones clínicas .....	46
2.4.7. Farmacología ocular .....	47
2.4.8. Interacciones bacteriológicas .....	49
2.4.9. Toxicidad y efectos secundarios .....	49
2.4.10. Contraindicaciones .....	50
<b>3. EFECTO POSTANTIBIÓTICO .....</b>	<b>51</b>
3.1. DEFINICIÓN .....	51
3.2. MECANISMOS DEL EPA .....	52
3.3. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN .....	54
3.4. FACTORES QUE AFECTAN AL EPA .....	55
3.5. FENÓMENOS RELACIONADOS CON EL EPA .....	56
3.5.1. "Postantibiotic Leukocyte Enhancement" .....	56
3.5.2. Disminución de la actividad bactericida durante el EPA .....	57
<b>4. FARMACOCINÉTICA OCULAR .....</b>	<b>59</b>
4.1. VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN LA INFECCIÓN OCULAR CORNEAL .....	61
4.1.1. Aplicación tópica .....	62
4.1.2. Inyección periocular .....	63

4.1.3. Tratamiento sistémico .....	65
4.1.4. Iontoforesis .....	66
4.1.5. Encapsulación liposomal de los antibióticos .....	66
<b>II.- <u>OBJETIVOS</u></b> .....	68
<b>III.- <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u></b> .....	70
<b>I. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i></b> .....	71
1.1. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EXPRESADA EN FUNCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS Y BACTERICIDAS .....	71
1.1.1. Microorganismos .....	71
1.1.2. Antibióticos .....	71
1.1.3. Medios .....	72
1.1.4. Concentración mínima inhibitoria .....	72
1.1.5. Concentración mínima bactericida .....	73
1.2. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EXPRESADA EN FUNCIÓN DEL EFECTO POSTANTIBIÓTICO ...	74
1.2.1. Preparación del inóculo .....	74
1.2.2. Cinética de crecimiento bacteriano .....	74
1.2.3. Eliminación del antibiótico .....	75
1.2.4. Recuentos bacterianos .....	75
1.2.5. Cuantificación del EPA .....	76

---

<b>2. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i></b> .....	77
<b>2.1. MODELO EXPERIMENTAL DE QUERATITIS BACTERIANA EN CONEJOS POR <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i> Y <i>PROTEUS VULGARIS</i>. TRATAMIENTO CON OFLOXACINO</b> .....	77
2.1.1. Animales de experimentación .....	77
2.1.2. Microorganismos .....	77
2.1.3. Soluciones oftálmicas .....	77
2.1.4. Anestésicos .....	78
2.1.5. Preparación del inóculo .....	78
2.1.6. Inoculación .....	78
2.1.7. Valoración clínica .....	79
2.1.8. Estudio microbiológico .....	79
2.1.9. Análisis estadístico de los resultados .....	79
<b>2.2. MODELO EXPERIMENTAL DE QUERATITIS BACTERIANA EN CONEJOS POR <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>. TRATAMIENTO CON TIAMFENICOL Y TOBRAMICINA</b> .....	82
2.2.1. Animales de experimentación .....	82
2.2.2. Microorganismos .....	82
2.2.3. Soluciones oftálmicas .....	82
2.2.4. Anestésicos .....	82
2.2.5. Preparación del inóculo .....	83
2.2.6. Inoculación .....	84
2.2.7. Valoración clínica .....	84
2.2.8. Estudio microbiológico .....	84
2.2.9. Evaluación del número de bacterias viables presentes en la córnea extraída .....	84
2.2.10. Estudio anatomopatológico .....	85
2.2.11. Análisis estadístico de los resultados .....	85

<b>IV. RESULTADOS</b> .....	86
<b>1. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS <i>IN VITRO</i></b> .....	87
1.1. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EXPRESADA EN FUNCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS Y BACTERICIDAS .....	87
1.1.1. Concentración mínima inhibitoria .....	87
1.1.2. Concentración mínima bactericida .....	88
1.2. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EXPRESADA EN FUNCIÓN DEL EFECTO POSTANTIBIÓTICO ...	90
1.2.1. Efecto sobre el crecimiento de <i>S. pneumoniae</i> ATCC 6303 tras la exposición durante una hora a varios antimicrobianos .....	90
1.2.2. Efecto sobre el crecimiento de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 tras la exposición durante una hora a varios antimicrobianos .....	92
1.2.3. Efecto sobre el crecimiento de <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 tras la exposición durante una hora a varios antimicrobianos ...	94
1.2.4. Efecto sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> ATCC 25922 tras la exposición durante una hora a varios antimicrobianos .....	96
1.2.5. Efecto sobre el crecimiento de <i>P. vulgaris</i> ATCC 13315 tras la exposición durante una hora a varios antimicrobianos .....	98
1.2.6. Efecto sobre el crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9721 tras la exposición durante una hora a varios antimicrobianos .....	99
<b>2. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS <i>IN VIVO</i></b> .....	104
2.1. MODELO EXPERIMENTAL DE QUERATITIS BACTERIANA EN CONEJOS POR <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i> Y <i>PROTEUS</i> <i>VULGARIS</i> . TRATAMIENTO CON OFLOXACINO .....	104
2.1.1. Resultados clínicos .....	104
2.1.1.1. Ensayo con <i>S. pneumoniae</i> (Tabla 9) .....	104
2.1.1.2. Ensayo con <i>P. vulgaris</i> (Tabla 10) .....	105

2.1.2. Resultados microbiológicos .....	108
2.1.2.1. Ensayo con <i>S. pneumoniae</i> (Tabla 11) .....	108
2.1.2.2. Ensayo con <i>P. vulgaris</i> (Tabla 12) .....	108
2.2. MODELO EXPERIMENTAL DE QUERATITIS BACTERIANA EN CONEJOS POR <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i> . TRATAMIENTO CON TIAMFENICOL Y TOBRAMICINA .....	110
2.2.1. Resultados clínicos (Tablas 13 y 14) .....	110
2.2.1.1. Grupo placebo .....	110
2.2.1.2. Grupo tobramicina .....	111
2.2.1.3. Grupo tiamfenicol .....	112
2.2.2. Resultados microbiológicos (Tablas 15 y 16) .....	114
2.2.2.1. Grupo placebo .....	114
2.2.2.2. Grupo tobramicina .....	114
2.2.2.3. Grupo tiamfenicol .....	115
2.2.3. Resultados del número de bacterias viables presentes en la córnea extraída .....	116
2.2.3.1. Grupo placebo .....	116
2.2.3.2. Grupo tobramicina .....	116
2.2.3.3. Grupo tiamfenicol .....	116
2.2.4. Resultados anatomopatológicos .....	117
<b>V. <u>DISCUSIÓN</u></b> .....	118
<b>1. EVALUACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL</b> .....	120
1.1. ELECCIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS .....	120
1.2. ELECCIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS .....	121
1.3. MODELO <i>IN VITRO</i> : EVALUACIÓN DEL EPA .....	122
1.3.1. Justificación del método .....	122
1.3.2. Cuantificación del EPA .....	124
1.3.3. Influencia de la concentración de antimicrobiano .....	130

1.3.4. El tiempo de exposición del microorganismo al antibiótico .....	132
1.3.5. Influencia de la concentración del inóculo .....	133
1.3.6. Fase de crecimiento de los microorganismos .....	135
1.3.7. Agitación mecánica .....	136
1.3.8. Influencia del medio de cultivo .....	136
1.3.9. Influencia del pH .....	138
1.4. MODELO <i>IN VIVO</i> .....	140
1.4.1. Elección del conejo como modelo experimental .....	141
1.4.2. Técnica de inoculación e inóculos que se ensayan .....	142
1.4.3. Valoración de la eficacia antibiótica .....	145
<b>2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS <i>IN VITRO</i></b> .....	146
2.1. EVALUACIÓN DE LA CMI/CMB .....	146
2.2. EVALUACIÓN DEL EPA .....	148
<b>3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS <i>IN VIVO</i></b> .....	154
3.1. EVALUACIÓN CLÍNICA .....	154
3.2. EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA Y ANATOMOPATOLÓGICA ..	161
<b>4. SIGNIFICADO BIOLÓGICO DEL EPA Y SU INFLUENCIA EN LA DOSIFICACIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS EN UN ENSAYO EXPERIMENTAL</b> .....	166
<b><u>VI. CONCLUSIONES</u></b> .....	173
<b><u>VII. BIBLIOGRAFÍA</u></b> .....	176
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	226
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	229

## **ABREVIATURAS**

0'15 M	0'15 Molar
1 N	1 Normal
AAC	Aminoglucósido ACetiltransferasa
AAD	Aminoglucósido ADeniltransferasa
ADN	Ácido DesoxiNucleótico
ADVP	Adicto a Droga por Vía Parenteral
AETD	Ácido Etilendiamino Tetraacético Disódico
AGAP	AminoGlucósido AntiPseudomonas
ANT	Aminoglucósido NucleotidilTransferasa
APH	Aminoglucósido Fosfotransferasa
ARN	Ácido RiboNucleico
ARN <sub>m</sub>	Ácido RiboNucleico mensajero
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Colección americana de cultivos patrón)
ATP	AdenosinTrifosfato
AUC	Area Under Curve (Área bajo la curva)
BHB	Brain Heart Broth (Caldo cerebro-corazón)
CMB	Concentración Mínima Bactericida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
EI	Enfermedades Infecciosas
EPA	Efecto PostAntibiótico
ES	<i>Error Standard</i> (Error estándar)
GM	Gentamicina
Ig A	Inmunoglobulina A
IM	IntraMuscular
IV	IntraVenoso
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
MH	Müller Hinton
MHB	<i>Müller Hinton Broth</i> (Caldo de Müller Hinton)
NN	Tobramicina
OFX	Ofloxacino

OI	Ojo Izquierdo
PABA	Ácido ParaAminoBenzoico
PALE	<i>PostAntibiotic Leukocyte Enhancement</i> (incremento postantibiótico leucocitario)
PBPs	<i>Penicillin Binding Proteins</i> (proteínas fijadoras de penicilina)
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i> (solución tamponada de fosfato)
PM	Peso Molecular
RA	Rifampicina
RN	Recién Nacido
rpm	revoluciones por minuto
Sd	Síndrome
SNC	Sistema Nervioso Central
TP	Tiamfenicol
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i> (Caldo de soja trypticasa)
UC	Úlcera Corneal
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

## **I.- INTRODUCCIÓN**

Las enfermedades infecciosas (EI) del polo anterior del ojo y en concreto, las queratitis bacterianas constituyen un motivo frecuente de consulta en la práctica médica. Son padecimientos comunes que producen una importantísima morbilidad en personas de todas las edades y de ambos sexos y, junto a las endoftalmitis, constituyen una de las infecciones más importantes del ojo, para la cual se consulta a los especialistas en EI.

Desde la introducción en 1935 de las sulfamidas y, posteriormente, de las penicilinas en 1942, son muchos los cambios que se han originado en el aspecto clínico y pronóstico de muchas EI, por la introducción, en rápida sucesión, de nuevos quimioterápicos que han ampliado nuestras posibilidades de acción directa sobre los diversos agentes patógenos<sup>1</sup>.

En el curso de una infección bacteriana intervienen una serie de variables como los mecanismos de defensa del huésped, la patología originada por la infección y la virulencia, metabolismo e inóculo del agente infectante. Por ello, la elección del quimioterápico tiene que estar en consonancia con el propósito preciso que se persigue al indicarlo, que puede ser la profilaxis, el tratamiento empírico urgente o la terapia perfectamente discriminada de una infección bien conocida.

La terapia antimicrobiana tiene como objetivo impedir o retrasar el crecimiento de los gérmenes en el lugar de la infección, permitiendo que la reducción de la población bacteriana facilite la acción de las defensas inmunológicas del organismo. Falta todavía información sobre la repercusión de muchos de los agentes que usamos sobre el sistema inmunitario. Además, la enfermedad puede modificar las propiedades farmacocinéticas del antimicrobiano alterando su absorción y/o disposición<sup>2</sup>.

Lo que se persigue, el ideal terapéutico de Ehrlich, es el hallazgo de un antimicrobiano con un alto índice terapéutico -medido en función de la relación entre la dosis máxima tolerada por el huésped y la dosis mínima que cura la infección o dosis terapéutica- y una baja tasa de desarrollo de resistencias<sup>1</sup>.

Así pues, la problemática que entraña la elección de un antibiótico comprende las pruebas de sensibilidad, pero también, y con la misma importancia, sus características farmacológicas, que son las que han de condicionar no solo su utilización, sino la vía de administración y el intervalo entre cada dosis en función del conocimiento de la absorción del antibiótico por las diferentes vías, su distribución por el organismo, eventual metabolización y eliminación, y la relativa inocuidad o potencial toxicidad<sup>3</sup>.

En la actualidad, hay cada vez más autores<sup>4-6</sup> de acuerdo en considerar que en la medida de la actividad antimicrobiana no basta con el conocimiento de estos parámetros sólo, sino que deben realizarse estudios de la actividad antimicrobiana en función del tiempo y del efecto postantibiótico (EPA) y de fenómenos biológicos asociados<sup>7, 8</sup> que se originan por un tratamiento.

Los modelos animales nos han proporcionado un mayor conocimiento sobre la patogénesis y el tratamiento de las úlceras corneales (UC) bacterianas, habiéndose desarrollado numerosos prototipos para simular queratitis bacterianas en humanos. La córnea es un tejido útil para estudiar la patogénesis de la infección debido a su fácil accesibilidad y a las deficientes defensas fagocíticas: siendo avascular, es fácilmente sensible a la infección y el progreso de la enfermedad puede observarse en ella sin dificultad<sup>9-11</sup>.

Antes de que un nuevo agente antibacteriano sea introducido para uso clínico, deben haberse desarrollado sobre él estudios sobre su actividad *in vitro* e *in vivo* sobre animales de experimentación primero y en una fase posterior ensayos clínicos en humanos. Así pues, los aspectos más importantes de estos estudios experimentales son la prevención y el tratamiento de las EI<sup>12</sup>.

Las queratitis plantean un problema grave para la visión del ojo, la necesidad de implantar un tratamiento farmacológico cuando aún se desconoce la etiología del germen infectante, nos lleva a la búsqueda de nuevos antimicrobianos que además de cumplir unos

perfiles farmacocinéticos posean una buena actividad sobre un amplio espectro de microorganismos.

Ofloxacino (OFX) es una fluorquinolona de amplio espectro cuya comercialización en su forma oftálmica aún no se ha realizado en nuestro país. En este trabajo nos proponemos valorar su actividad *in vitro* frente a 6 cepas de colección como representantes de microorganismos gram positivos y gram negativos, que como se verá son responsables comunes de UC, haciendo especial hincapié en el estudio del EPA y su implicación en las pautas de dosificación de antimicrobianos. Por último, realizaremos un estudio de su eficacia *in vivo* en animales de experimentación a los que provocaremos una úlcera corneal bacteriana.

## 1.- LA ÚLCERA CORNEAL BACTERIANA

Las infecciones bacterianas de la córnea son amenazas graves para la visión. Las úlceras de la córnea se presentan en el contexto de un traumatismo ocular o uso de lentes de contacto, después de cirugía, o cuando hay enfermedad preexistente de la córnea.

Son procesos de extrema gravedad y deben ser considerados como urgencias oftalmológicas. Su evolución espontánea o los casos mal tratados llevan consigo una extensión de la infección con afectación de toda la córnea y en algunos casos conducen a la perforación y pérdida del globo ocular. Precisan, pues, un tratamiento precoz y eficaz para preservar la mayor capacidad funcional posible del ojo.

### 1.1.- DEFINICIÓN

Es la invasión de la córnea por bacterias proliferantes de patogenicidad y virulencia variables, que conduce a la formación de un absceso estromal y se acompaña de signos inflamatorios de intensidad variable. La úlcera corneal aparece como un área de infiltrado de color blanco, gris o amarillo que se tiñe con fluoresceína<sup>13, 14</sup>.

### 1.2.- ETIOLOGÍA

Se ha encontrado que los gérmenes responsables de las queratitis bacterianas varían de una región y de un país a otro<sup>15</sup>, siendo con mayor frecuencia hallados: *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella*, *Enterobacteriaceae* (*Proteus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Serratia* y *Enterobacter*) y *Streptococcus* alfa-hemolítico<sup>16-21</sup>.

### 1.3.- DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

En orden a esclarecer las diferentes etiologías de las úlceras corneales es necesario tener siempre presente que existen otras situaciones en que hay una úlcera corneal cuyo origen no es infeccioso o no necesariamente bacteriano, por lo que atenderemos a los siguientes criterios de identificación que nos situarán en el contexto clínico real. Así, distinguiremos:

#### 1.3.1.- Infecciones bacterianas

Las bacterias son causa de queratitis por invasión directa, por toxinas o por hipersensibilidad. El epitelio corneal es la barrera más resistente a la penetración microbiana. La membrana de Descemet impide el acceso de las bacterias pero no de los hongos<sup>22</sup>.

Las úlceras centrales a menudo están provocadas por invasión directa y precedidas de traumatismo. Típicamente son blancas o amarillentas, como resultado del infiltrado purulento. Pueden producir hipopión y perforación corneal, especialmente si el tratamiento no es el adecuado. Las úlceras y las queratitis epiteliales marginales tienen buen pronóstico, en la mayoría de las ocasiones se asocian a toxinas estafilocócicas y con frecuencia recidivan.

En general, las úlceras corneales causadas por gérmenes muy virulentos progresan rápidamente y dan lugar a reacciones inflamatorias mayores como la formación de hipopión. Por el contrario, las úlceras debidas a microorganismos oportunistas tienden a ser tórpidas y a extenderse superficialmente. Si bien algunas úlceras corneales bacterianas presentan ciertas características clínicas distintivas, el tratamiento no debe fundamentarse en la impresión clínica<sup>23</sup>.

El *Streptococcus pneumoniae* es la única bacteria patógena corneal verdadera, todas las demás son oportunistas y provocan infección si las defensas del huésped están debilitadas (traumatismo). El *Staphylococcus aureus*, productor de exotoxinas, es el organismo más frecuentemente implicado en las infecciones corneales. También pueden causar queratitis las especies de *Streptococcus spp.*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Pseudomonas spp.* (colirios contaminados) y de modo más excepcional *Bacillus subtilis*, los organismos *Proteus*, *Serratia*, *Klebsiella*, *E. coli* y otros. Además, aunque menos común, se encuentra la infección por la especie *Moraxella*, los diplococos gram negativos y, en ocasiones, las infecciones por anaerobios gram negativos y gram positivos. Ocasionalmente se ha encontrado *Propionibacterium acnes* -un anaerobio- como causa de úlcera corneal<sup>22, 24</sup>.

En las úlceras corneales limbares y en los infiltrados pueden desarrollarse microorganismos patógenos y esto debe tenerse siempre en cuenta. Así, la *Alternaria* se ha hallado en los infiltrados marginales semejando a un infiltrado inmune y, ocasionalmente, organismos gram negativos se han encontrado en el pénfigo ocular con úlceras corneales. Es necesario, por tanto, obtener un diagnóstico de laboratorio a pesar de sospechar una causa inmune o de otros factores como problema primario<sup>16</sup>.

### 1.3.2.- **Queratopatías tróficas**

Las queratopatías tróficas pueden conducir a la lisis del estroma, especialmente, cuando se asocian con queratitis seca, y también, a una perforación en ausencia de infiltrado celular. La falta de infiltrado celular puede ayudarnos a distinguir las de una causa bacteriana<sup>16</sup>.

### 1.3.3.- **Queratopatías tóxicas**

Se ven a menudo en la utilización de fármacos tales como anfotericina B, idoxuridina, neosporina, gentamicina y anestésicos locales. Si estos fármacos se utilizan durante 10 ó más días, pueden observarse áreas con múltiples infiltrados en el estroma<sup>16</sup>.

### 1.3.4.- **Queratitis traumáticas**

Por exposición luminosa (esquiadores, soldados) y las ocasionadas por lentillas: suelen ser superficiales. Se tratan con vendajes compresivos y pomadas epitelizantes (después de extraer las lentillas en el segundo caso). Se pueden emplear calmantes orales<sup>22</sup>.

### 1.3.5.- **Infecciones víricas**

El herpes simple puede afectar a la conjuntiva, córnea y úvea, pero lo más frecuente y la infección que amenaza a la vista es debida a la queratitis del epitelio o estroma<sup>15</sup>. La sensibilidad corneal está disminuida y los frotis muestran células multinucleares y ausencia de bacterias. La prueba de anticuerpo con fluorescencia es positiva. Con frecuencia hay antecedentes de queratitis herpética o herpes labial<sup>16</sup>. Se pueden tratar con idoxuridina y alguno de los agentes antivirales por vía oral y, últimamente, se usa el aciclovir.

### 1.3.6.- **Infecciones por hongos**

El uso prolongado y variado de antibióticos, corticoides o inmunosupresores favorece la aparición de micosis<sup>25</sup>. Las queratitis fúngicas producen ulceración superficial y diversos focos de infiltrados satélites. Se forma un absceso corneal. Los hongos atraviesan

fácilmente la membrana de Descemet y provocan inflamación ocular importante con hipopión<sup>22</sup>.

Las queratitis por hongos se originan con mayor frecuencia por *Candida spp.*. Menos frecuentemente se han encontrado hongos filamentosos, *Aspergillus*, *Cephalosporium* y *Fusarium*. La mayoría se comportan como oportunistas y no siempre se distinguen clínicamente de las de otros orígenes, por eso son necesarios las pruebas de laboratorio<sup>26</sup>. El tratamiento es a base de anfotericina B, nistatina, miconazol y ketoconazol<sup>22</sup>.

#### 1.3.7.- Queratitis por parásitos

Son poco frecuentes, causadas por *Acanthamoeba spp.*, oportunistas y de vida independiente<sup>27</sup>. Son tórpidas y muestran muchas de las características de una úlcera corneal por hongos filamentosos. Pueden originar una queratitis purulenta y debe pensarse en ellas en los casos de úlceras muy graves resistentes al tratamiento. El diagnóstico lo da el hallazgo de quistes o trofozoitos<sup>28</sup> desde los medios líquidos (soluciones de manejo de lentillas, humor acuoso, etc.), lentillas y estuches, y la biopsia corneal que evalúa la presencia histológica de los quistes.

#### 1.4.- PATOGENIA

La piel y las membranas mucosas intactas constituyen la primera barrera de defensa contra la infección. El mecanismo de lavado continuo por las lágrimas, así como la presencia de lisozima, betalisisnas y anticuerpos naturales (Ig A) en ellas, desempeña un papel importante en la defensa contra la infección<sup>29</sup>. Además, las reacciones inespecíficas contra una noxa, como son la fagocitosis de los agresores por los neutrófilos y macrófagos, ayudan a un huésped no comprometido a convivir o destruir al oportunista cuando éstos

sean bacterias u hongos. A la semana ya está en marcha la respuesta celular y humoral específica que es necesaria para el huésped no comprometido sólo si la inoculación microbiana es importante.

Como ocurre con la mayoría de los oportunistas, una inoculación pequeña puede manejarse razonablemente bien por las defensas del ojo normal, de manera que sólo en un ojo comprometido inmunológicamente se producirá enfermedad.

Con excepción de las úlceras por *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium diphtheriae* y las especies de *Listeria*, en general, se precisa una lesión epitelial previa que rompa la barrera protectora que constituye el epitelio corneal<sup>17, 18, 30, 31</sup>.

Existen situaciones de compromiso local: antecedente de traumatismo con o sin cuerpo extraño, ojo seco, abuso de fármacos tóxicos (anestésicos tópicos, agentes cicatrizantes, antibióticos e idoxuridina), abuso de lentes de contacto, queratopatías previas (queratopatía bullosa, queratitis metaherpética, quemaduras térmicas o químicas, etc.). Si se suman a enfermedades sistémicas pueden producir un huésped inmunocomprometido<sup>32-34</sup> y pueden contribuir a la producción de una infección corneal.

Los síndromes de ojo seco predisponen también por disminución del efecto mecánico de barrido de las lágrimas, lo que permitiría o facilitaría la adherencia de las bacterias al lecho del defecto epitelial, y por la disminución de lisozimas, betalinas y anticuerpos.

El abuso de medicaciones tópicas (antibióticos, idoxuridina, anestésicos, etc.) no sólo favorece la infección bacteriana por su efecto tóxico sobre el epitelio, sino que además altera el equilibrio de la flora conjuntival (al desplazar la flora gram positiva normal del saco conjuntival y reemplazarla por una anormal gram negativa) y modifica el cuadro clínico dificultando el reconocimiento de su verdadera naturaleza<sup>13, 16</sup>.

Las queratitis bacterianas asociadas con el uso de lentillas requieren la presencia de organismos patógenos en cantidad suficiente para vencer las defensas locales y romper el epitelio corneal para conseguir la penetración en el estroma corneal. Los organismos más frecuentemente asociados con queratitis microbiana requieren un defecto epitelial para conseguir acceder al estroma.

El mecanismo de formación de infiltrados y úlceras en la córnea se produce probablemente por la combinación de leves traumatismos sobre la córnea, provocados bien en la inserción o remoción de la lentilla, por roturas de la misma, por hipoxia o mala adaptación, o bien por un cuerpo extraño, que originan siempre una mínima desepitelización, y esto unido a la presencia de bacterias, virus u hongos en la lágrima.

El uso de lentillas, por sí mismo, se cree que no altera la flora microbiológica conjuntival. Sin embargo, los estuches donde se guardan las lentillas y sus soluciones se contaminan con gran frecuencia por una amplia variedad de microorganismos, y a ellos se atribuye la causa de las infecciones<sup>35-37</sup>.

Las bacterias pueden adherirse directamente a las lentillas blandas y parece que esta adherencia es mayor cuando las lentillas están cubiertas por mucina y proteínas<sup>38</sup>. Se ha visto que *P. aeruginosa* se adhiere a las lentillas blandas usadas y sin usar, aunque, no está claro si este organismo tiene una capacidad preferencial para unirse en comparación con otras bacterias. También se han recogido desde la córnea organismos tales como *Mycobacterium fortuitum* y *chelonei*<sup>39, 40</sup> y *Capnocytophaga*.

Las infecciones propiamente dichas en los portadores de lentillas se producen habitualmente por *S. epidermidis* y *S. aureus*. *Pseudomona aeruginosa* es la que con mayor frecuencia se asocia con infecciones por lentillas blandas o soluciones contaminadas. También podemos encontrarnos *S. pneumoniae* y *Enterobacteriaceae* (*Proteus* y *E. coli*).

Desde el punto de vista sistémico, hay que valorar la presencia de alteraciones que sean capaces de disminuir las defensas del organismo: tratamientos con fármacos inmunosupresores o corticoides, último trimestre del embarazo, alcoholismo crónico, malnutrición severa, drogadicción, síndromes de inmunodeficiencia (Sd. de Wiskott-Aldrich), diabetes, quemaduras corporales extensas, infancia, vejez<sup>16</sup>.

Así, la barrera del epitelio corneal puede dañarse en el déficit de vitamina A y la inmunidad celular estará disminuida en los casos de déficit proteínico y calórico. Es comprensible, pues, que las úlceras corneales nutricionales severas se observen con mayor frecuencia en ciertas partes del mundo en las cuales la malnutrición constituye un problema importante<sup>16</sup>.

El recién nacido (RN) está sujeto a infecciones oportunistas dado que el sistema inmune celular se desarrolla lentamente.

El anciano presenta una disminución de la capacidad del organismo para reaccionar frente a agentes invasores mediante mecanismos inflamatorios y celulares.

Los organismos patógenos oportunistas se han considerado contaminantes o habitantes no dañinos, pero en un individuo inmunocomprometido pueden multiplicarse y producir una enfermedad corneal<sup>41</sup>. Así son más frecuentes en estos sujetos la infección corneal por: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* alfa y beta hemolítico, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia* y *Nocardia*.

## 1.5.- ANATOMÍA PATOLÓGICA

El lugar de infección en la úlcera corneal bacteriana es el estroma.

La queratitis se puede presentar en heridas puntiformes o pequeñas heridas lineales de la córnea, penetrantes ambas, y tiene un inicio y una evolución semejante a la que tiene lugar en la instauración de cualquier úlcera corneal infecciosa.

La pérdida de sustancia empieza siempre a nivel del epitelio, alrededor de la perforación corneal, y las lesiones se van haciendo progresivamente más profundas. Después de afectarse el epitelio, la membrana de Bowman, siempre muy frágil, es destruida rápidamente por los leucocitos polimorfonucleares.

Los bordes de la lesión representan la zona de extensión o crecimiento. Debajo del epitelio y de la membrana de Bowman encontramos agrupaciones de polimorfonucleares y de gérmenes, y es por lo que para efectuar un cultivo deberemos practicar un legrado a nivel de la lesión, lo suficientemente profundo para que nos pueda poner de manifiesto la presencia de los gérmenes y poder saber, a través del antibiograma, el antibiótico más eficaz para cada caso.

La presencia de leucocitos en el endotelio y en el estroma corneal puede ser un problema grave, ya que pueden originar alteraciones en la estructura endotelial en virtud de sus enzimas lisosómicas y desencadenar así un edema corneal permanente.

En todo foco de queratitis profunda o de úlcera corneal infecciosa se origina una producción de enzimas proteolíticas a partir del epitelio necrosado, que va a ser responsable de la progresión de la infección a través del estroma, no sólo en extensión, sino también en profundidad, ayudada por el propio edema del estroma corneal.

Los polimorfonucleares van aumentando en cantidad e infiltrando más capas del parénquima corneal, estableciéndose una cadena de progresión que llevará a la aparición de un absceso corneal, a veces con un rodete de crecimiento evidente a simple vista. La membrana de Descemet es muy resistente, persistiendo bastante tiempo normal a pesar de la presencia de polimorfonucleares en sus dos caras. La evolución de un absceso corneal es hacia la perforación<sup>42</sup>.

El hallazgo de un absceso anular en la córnea es muy poco frecuente en las enfermedades infecciosas oculares. Su presencia es indicio de la naturaleza devastadora de la reacción inflamatoria y generalmente es de pronóstico grave para el ojo. Aunque *Pseudomonas aeruginosa* y el género *Proteus* pueden producir abscesos anulares, las especies *Bacillus* son las que se aíslan con mayor frecuencia<sup>43</sup>.

## 1.6.- CLÍNICA

El dolor, de inicio agudo, es un síntoma habitual en las afecciones de la córnea, debido a su rica inervación con fibras para el dolor. Aumenta con el parpadeo. Los estímulos luminosos ocasionan contracción dolorosa del iris hiperémico con sensación de fotofobia y potencian la secreción lacrimal con aparición de epífora (lagrimeo). El parpadeo sobre las superficies inflamadas produce una sensación de cuerpo extraño y blefarospasmo. Es casi norma un déficit visual causado por la infiltración corneal<sup>22</sup>.

En la **inspección** se observa inyección y edema conjuntival y palpebral, con un defecto epitelial que típicamente tiende a extenderse hacia el centro de la córnea alejándose de las arcadas vasculares del limbo, a diferencia de las úlceras inflamatorias no infecciosas que suelen ser límbicas. Se observa una inyección ciliar debida a la irritación de las terminaciones nerviosas corneales que produce una vasodilatación refleja de los vasos del iris y cuerpo ciliar. Hay una infiltración (infiltrado que puede ser grisáceo y necrótico) y edema estromal variables que pueden estar alejados de la úlcera. Supuración estromal

localizada (abscesos estromales que pueden ser evidentes como infiltrados pequeños y profundos, y pueden observarse plaquetas fibrinosas en el endotelio). Secreción mucopurulenta adherida al lecho de la úlcera. Reacción inflamatoria variable sobre la cámara anterior: pliegues endoteliales, humor acuoso fibrinoide y en ocasiones hipopión. El hipopión es causado por los efectos tóxicos del organismo sobre los vasos del iris y del cuerpo ciliar con una gran producción resultante de fibrina y leucocitos polimorfonucleares<sup>13</sup>.

La pupila suele ser normal al igual que la tensión ocular.

Es importante el seguimiento de la evolución de una úlcera corneal bacteriana<sup>44, 45</sup>. El dolor, los cambios en el área de la superficie ulcerada, un aumento en la infiltración celular del estroma, un aumento de la reacción en la cámara anterior, la lisis del estroma corneal y a veces la lisis de la esclera pueden alertarnos acerca de futuros problemas. Lo más importante a seguir es la supuración y el grado de infiltración, más que el hipopión.

La reacción inflamatoria severa puede conducir a cambios permanentes como cataratas polares anteriores, sinequias posteriores y anteriores, aumento de la presión intraocular, descematocele o perforación<sup>44</sup>, cicatrices en el estroma y edema de la córnea.

## 1.7.- FORMAS CLÍNICAS DE PRESENTACIÓN

### 1.7.1.- *Streptococcus pneumoniae*

Diplococo, aerobio facultativo, no esporulado, se dispone a pares, con forma oval y con la extremidad distal de cada par con forma de punta de lanza y en forma de cadenas. Gram positivo, alfa-hemolítico, encapsulado. Para su crecimiento puede requerir un ambiente rico en CO<sub>2</sub>. Puede ser aislado de la faringe en el 30-70% de las personas en condiciones aparentemente normales<sup>46</sup>. Su proximidad con el ojo puede explicar su

frecuencia en queratitis, dacriocistitis y endoftalmitis postquirúrgicas. La dacriocistitis crónica puede ser un factor causante de queratitis asociada con traumatismos corneales menores. Puede presentarse como agente saprófito en el párpado o en el saco conjuntival.

La úlcera corneal puede ser oval o redonda, de bordes bien definidos y excavados, localizada o con tendencia a propagarse en una dirección, generalmente central, y de color blanco-grisáceo. Desarrolla edema epitelial e infiltrado estromal adyacentes discretos, reacción de la cámara anterior intensa con hipopión frecuente y puede perforarse<sup>13, 47</sup>.

### 1.7.2.- Especies de *Staphylococcus*

Cocos gram positivos, no esporulados, aerobios facultativos, inmóviles, tienden a agruparse en masas desordenadas que recuerdan los racimos de uva; también como elementos únicos, a pares, formando tétradas o en cadenas cortas de 3 a 4 células. Crecen fácilmente sobre los medios de cultivo comunes y en presencia de concentraciones elevadas de cloruro sódico (alrededor de un 7-8%). Relativamente resistentes al calor, a la desecación y a los desinfectantes<sup>46</sup>.

Colonizadores habituales de la piel, en general se admite que la capacidad para causar enfermedad en este género es una combinación entre factores de virulencia de los estafilococos y alteraciones en la resistencia del huésped. El estafilococo es una causa rara de queratitis en el ojo sano, pero puede verse específicamente en cuadros postraumáticos<sup>44</sup>.

Se considera a *Staphylococcus aureus* como patógeno potencial de gran importancia y su virulencia viene determinada principalmente por la producción de coagulasa y la fermentación del manitol. Se encuentra en la piel, en la nariz y en la conjuntiva y es un agente patógeno oportunista.

*Staphylococcus epidermidis* se denomina así, por ser habitual de piel y mucosas; es el más común de los estafilococos coagulasa negativos aislados en clínica y está alcanzando más importancia en patología humana. Es causa frecuente de queratitis en córneas con enfermedades previas y en individuos que no mantienen una higiene correcta de sus lentes de contacto. Su acción es toxicógena y patogénica<sup>48</sup> y aunque *S. aureus* es más virulento, la resistencia a antibióticos es más frecuente en esta especie.

La úlcera corneal producida por este género suele ser oval, localizada y de bordes bien definidos, se inicia muy frecuentemente en la periferia y, en principio, es superficial con poca reacción de la cámara anterior, aunque puede profundizar y formar absceso intraestromal. Evolución en general más lenta<sup>13</sup>.

### 1.7.3.- *Pseudomonas aeruginosa*

Bacilo gram negativo, no esporulado, aerobio obligado, móvil, no fermentador, oxidante. Crece fácilmente en los medios de cultivo comunes donde puede producir piocianina que difunde a través de los mismos. Su hábitat está constituido generalmente por el suelo y el agua, presente en plantas, frutas y verduras. Se aísla en condiciones normales en un 10% de las muestras de heces humanas y ello puede ser el origen de algunas epidemias y de la contaminación cutánea. Puede encontrarse en las zonas más húmedas de la piel (ingles y axilas) y en la saliva<sup>46</sup>.

Se ha encontrado como agente contaminante en hospitales, en soluciones de fluoresceína<sup>49</sup>, en embellecedores de pestañas<sup>50</sup> y en los estuches de lentes de contacto mal higienizados. Se ha observado como causa de infección en pacientes jóvenes y sanos con hábitos higiénicos poco adecuados<sup>37</sup> y en queratitis en pacientes comatosos<sup>51</sup>. Los huéspedes inmunocomprometidos están muy predispuestos a la infección por esta especie. Su virulencia guarda relación con la movilidad y la producción de una colagenasa

calcio dependiente, que es inhibida por el ácido etilendiamino-tetraacético disódico (AETD), pero no por la cisteína.

Es quizás el organismo gram negativo que con más frecuencia produce úlceras corneales y que puede derivarse de una ligera abrasión o de intervenciones quirúrgicas por eliminación de cataratas<sup>46</sup>.

Presenta un curso típicamente rápido y virulento, con un tiempo de latencia corto (18 horas) y una evolución rápida (puede doblar el tamaño en 24 horas) por la elaboración de enzimas proteolíticas que destruyen el colágeno estromal. La ulceración es central o paracentral, irregular y extensa con gran infiltración estromal y edema epitelial que, típicamente, es difuso y alejado de la úlcera. A veces se acompaña de "anillos inmunológicos" por activación de la vía alternativa del complemento. Se acompaña de una importante secreción mucopurulenta amarillo-verdosa adherente a la úlcera. La reacción de la cámara anterior es intensa con frecuente hipopión. Forma descematocele y perforación de forma frecuente y precoz<sup>13</sup>.

La infección puede permanecer latente durante largo tiempo y puede recidivar a los días de interrumpir el tratamiento. Por esto, los tratamientos deben continuarse varias semanas después de la aparente cura clínica. Cuando la infección corneal se extiende a la esclera, el tratamiento médico se hace difícil, haciéndose necesario la queratoplastia y la crioterapia aplicada a la córnea circundante y al limbo esclerocorneal.

#### 1.7.4.- *Pseudomonas fluorescens*

Responsable de queratitis en ojos con anomalías previas. Es menos destructivo que *P. aeruginosa* debido a que no produce colagenasa.

### 1.7.5.- Especies de *Moraxella*

Cocobacilos o bacilos cortos gram negativos, no esporulados, aerobios obligados, inmóviles, no fermentadores, no oxidantes. Se disponen a pares, aislados o en cadenas cortas; algunas cepas presentan un aspecto filamentoso. Crecen sobre medios de cultivo comunes y en las células epiteliales descamadas. No se aíslan en el ambiente, pero es habitante normal del tracto respiratorio superior, del tracto urogenital y de la piel del hombre y varios animales. Se considera patógeno oportunista<sup>46</sup>.

La especie aislada con mayor frecuencia en infecciones oculares es la *M. lacunata*, responsable de blefaroconjuntivitis crónicas que se localizan en los márgenes palpebrales cercanos a los ángulos de los ojos, con producción de un exudado mucopurulento. En ocasiones pueden evolucionar a una úlcera corneal. Es probable que la infección pueda originarse en la nasofaringe de los propios individuos<sup>46</sup>.

La úlcera es indolora, ovalada y periférica (en el tercio inferior de la córnea), con borde excavado en dirección al centro corneal. Suele ser localizada y de evolución tórpida, avanzando en profundidad hacia el estroma con poca reacción de la cámara anterior y sólo en cerca de la mitad de los casos presenta hipopión<sup>13</sup>. Generalmente afecta a un huésped debilitado (ancianos, alcohólicos, diabéticos, malnutridos, etc.)<sup>52</sup>.

### 1.7.6.- Enterobacteriaceae

Las especies como *E. coli*, *Aerobacter* y *Proteus* son poco frecuentes como responsables de queratitis.

El agente que con más frecuencia se aísla en las infecciones oculares de este grupo es el *Proteus vulgaris*<sup>53</sup>, que origina queratitis muy severas, con perforación y úlceras anulares.

*Serratia marcescens* es un organismo oportunista que se encuentra en el suelo, pero no en la conjuntiva normal. Se ha observado en los estuches de las lentes de contacto. Su acción viene mediada por una endotoxina y una proteinasa que pueden causar infiltrados estromales periféricos y úlcera corneal paracentral severa con perforación<sup>54</sup>.

*Klebsiella* se ha encontrado como responsable de úlceras corneales en individuos debilitados.

#### 1.7.7.- Especies de *Bacillus*

Bacilos gram positivos, aerobios obligados o facultativos, a menudo móviles por flagelos laterales, forman esporas en posición central o paracentral, que no deforman la bacteria. En el estado de esporulación pueden producir antibióticos. Crecen fácilmente en medios de cultivo comunes. Son muy ubicuos en la naturaleza, aislándose del suelo, agua y polvo; alguna especie forma parte de la flora intestinal normal del hombre y algunos animales<sup>46</sup>.

*Bacillus cereus* es el patógeno ocular más importante en su género y posiblemente uno de los organismos más destructivos que afectan al ojo. La mayoría de los casos proceden de una diseminación hematógena, generalmente entre individuos ADVP. La panoftalmítis puede seguir a un traumatismo penetrante producido por un cuerpo extraño metálico. De forma característica aparece un cuadro de dolor severo en las primeras 24 horas de la lesión, seguido de quemosis, edema periorbitario y proptosis extrema. Poco después se instala una febrícula acompañada de leucocitosis moderada por polimorfonucleares. Se forma un anillo de edema en la córnea periférica seguido del desarrollo rápido de un absceso corneal circunferencial. Debe sospecharse infección por *B. cereus* en toda lesión penetrante causada por un cuerpo extraño metálico que se produce en un ambiente en el que la contaminación con tierra es posible.

## 1.8.- DIAGNÓSTICO

Es imprescindible el diagnóstico etiológico, sobre todo en las úlceras centrales<sup>55</sup>. El curso, la morfología clínica de la lesión corneal y una extensión citológica pueden ser de gran valor para iniciar el tratamiento. El cultivo es obligatorio.

A excepción tal vez del curso fulminante y la necrosis extensa típicas de la queratitis por *Pseudomonas*, el cuadro clínico es en extremo inespecífico, sin olvidar que una queratitis previamente tratada o una queratopatía sobreinfectada (úlceras neurotróficas, metaherpéticas, etc.) pueden presentar un cuadro clínico totalmente diferente al habitual para el germen de que se trate. Por lo tanto, sería arriesgado instaurar un tratamiento específico por la simple apariencia clínica.

El examen con fluoresceína debe hacerse antes de evaluar la sensibilidad corneal, ya que esta prueba puede dejar puntos o líneas que se teñirían. La sensibilidad disminuye en la queratitis por herpes simple.

El estudio microbiológico nos confirmará o descartará el carácter infeccioso bacteriano del proceso, y nos permitirá establecer unas guías acerca de la sensibilidad del germen causal a los diferentes antibióticos. Hay que realizarlo antes de cualquier tratamiento, especialmente antibiótico, ya que un tratamiento previo incorrecto puede hacer imposible la identificación posterior del germen causal y crearnos grandes dificultades para su tratamiento.

La tinción de Gram evidencia bacterias y levaduras; la de Giemsa muestra las hifas, las células gigantes multinucleadas, las inclusiones intracitoplasmáticas y las características morfológicas celulares<sup>56</sup>. Las inclusiones intranucleares pueden verse con la tinción de Papanicolau con fijadores ácidos. Deben reservarse varios portaobjetos adicionales para tinciones especiales a efectuar más adelante si se considerara necesario.

La extensión teñida con Gram, cuando sea positiva nos permitirá realizar una primera identificación genérica del germen causal y orientar el tratamiento inicial con más precisión. Sin embargo, el Gram tampoco tiene un valor absoluto: en el 20% de los casos es negativo, el 20% muestra dos o más gérmenes y sólo el 60% muestra un único germen<sup>13</sup>.

Aún en los casos positivos, la correcta identificación del germen causal determinada por su concordancia con el resultado final del cultivo no se consigue en todos los casos. Pueden cometerse errores por confusión con la flora normal de la capa lagrimal, por mala técnica de tinción que provoca una lesión de la pared bacteriana que altera sus características tincionales, o por tratamientos antibióticos previos.

En los casos en que el Gram muestra un único germen, la identificación correcta del mismo se consigue en un 75% de los casos, siendo su fiabilidad mucho mayor cuando se trata de bacilos gram negativos o cocos gram positivos (hasta un 89-90%) y muy inferior si se trata de bacilos gram positivos o cocos gram negativos (sólo en 25%). Cuando el Gram muestra dos o más gérmenes, la correcta identificación se consigue sólo en un 37%.<sup>17, 18</sup>.

El medio de agar sangre permite el crecimiento de la mayoría de los agentes patógenos aerobios y algunos hongos. En agar chocolate crecen las especies de *Moraxella*, *Neisseria* y *Haemophilus*. El caldo de tioglicolato posee un agente reductor en donde crecen los organismos aerobios y los anaerobios (*Actinomices*); los primeros crecen cerca de la superficie y los segundos por debajo de ella. El medio de Löwenstein-Jensen puede usarse para el cultivo de *Mycobacterium* y *Nocardia*. El medio de Thayer-Martin es un agar chocolate enriquecido que contiene antibióticos y es de elección para *Neisseria*. El medio de Sabouraud sin cicloheximida (un inhibidor de hongos saprófitos) es selectivo para hongos, tiene un pH ácido que inhibe el crecimiento bacteriano y se incuba a temperatura ambiente (26°C).

El trabajo mínimo del laboratorio consistirá en un Gram y un cultivo en agar sangre. Si se sospecha la existencia de hongos, se hará un cultivo adicional en Sabouraud. Y si se dispone de material suficiente debe hacerse un Giemsa y un tioglicolato.

Cultivos negativos de 3 a 11 días pueden indicar úlcera no bacteriana, que el tratamiento antibiótico previo ha inhibido el crecimiento del organismo, que se han tomado muestras inadecuadas o técnicas de cultivo inadecuadas. Los cultivos en anaerobiosis deben realizarse cuando persiste la infección. Además, debe buscarse siempre la existencia de parásitos.

### **1.9.- TRATAMIENTO**

El carácter grave y la evolución a veces muy rápida de las úlceras bacterianas no permite esperar los dos o tres días precisos para tener los resultados de los cultivos.

La elección del antibiótico a utilizar de forma inicial se atenderá a los siguientes criterios: frecuencia, cuadro clínico y tinción con Gram. Se aconseja utilizar siempre que sea posible un solo antibiótico, pero por otro lado, la extrema variabilidad de gérmenes causantes de una queratitis hace imposible diseñar una pauta que cubra totalmente todo el espectro de gérmenes.

Confirmada la naturaleza bacteriana de la úlcera, la elección del antimicrobiano vendrá determinada por el resultado de las pruebas de sensibilidad, lo cual nos permitirá corregir o seguir con el tratamiento iniciado<sup>13</sup>.

En principio, no todos los antibióticos tienen o actúan con el mismo mecanismo de acción sobre la bacteria y no todos tienen una capacidad de penetración ocular suficiente para ser elegidos como tratamiento<sup>57</sup>. Por ello, a igualdad sensibilidad antimicrobiana se

elegirán los antibióticos mejor tolerados, los que posean una mayor concentración corneal y los que al mismo tiempo sean más económicos<sup>58</sup>.

Los objetivos que se persiguen con el tratamiento son detener las alteraciones estructurales adicionales, promover la curación del estroma y la reepitelización corneal<sup>59</sup>.

En general, la vía de administración más utilizada es la tópica mediante el uso de gotas fortificadas. Y, así, según el microorganismo infectante las indicaciones actuales aconsejan utilizar cefalosporinas frente a *Streptococcus* y *Staphylococcus*<sup>60</sup>, las cuales generalmente son más activas contra la penicilasa de estas bacterias que bacitracina, eritromicina y lincomicina<sup>16</sup>. Penicilina G se aconseja frente a cocos gram negativos (*Neisseria*) y aminoglucósidos frente a bacilos gram positivos (*Corynebacterium*) y gram negativos (*Pseudomonas*).

En las úlceras extensas se administrará una inyección subconjuntival de cefazolina y tobramicina o gentamicina, en espera de los cultivos<sup>22</sup>.

El tratamiento sistémico debe reservarse para la supuración escleral o para impedir la perforación corneal o en los casos en que esta exista<sup>61</sup>, y se hará con cefazolina en el caso de cocos y con aminoglucósidos antipseudomonas (AGAP) en el caso de bacilos. También se utiliza esta vía en situaciones especiales como es el caso de la queratoconjuntivitis tuberculosa<sup>22</sup>.

No obstante, a pesar de los avances en el tratamiento, el resultado de las UC es, a menudo, no satisfactorio y la experiencia clínica y los estudios experimentales *in vivo* enfatizan la importancia crucial de un inicio precoz del tratamiento, e invitan a la búsqueda de nuevos antimicrobianos.

## 2.- ANTIMICROBIANOS

### 2.1.- OFLOXACINO

Análogo del ácido nalidíxico, es un quimioterápico de síntesis introducido en la práctica clínica en los años 85/86. Activo por vía oral, actúa bloqueando la acción de la ADN-girasa bacteriana inhibiendo la síntesis del ADN. Bactericida rápido, de amplio espectro. Su perfil farmacocinético es superior al del ciprofloxacino.

#### 2.1.1.- Estructura química

Derivado de la piridona ácido carboxílico, la introducción de un átomo de flúor en posición 6, y de un anillo piperquina en posición 7, lo clasifica dentro de las quinolonas fluoradas. Posee, además, un enlace en anillo del nitrógeno 1 y el carbono 8 del núcleo quinolónico y un grupo metilo en la posición carbono 3 del anillo oxacina<sup>62</sup>.

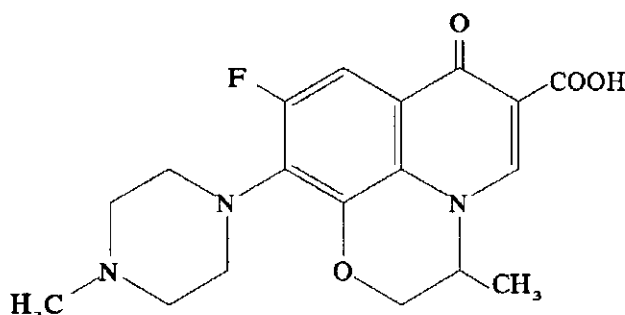


Fig. 1: Estructura química de ofloxacin.

#### 2.1.2.- Propiedades físico-químicas

Cristales o polvo cristalino opalescente, blancuzco a amarillo pálido. Termorresistente y estable a temperatura ambiente, fotosensible, inodoro, de sabor

amargo, muy soluble en ácido acético glacial, poco soluble en cloroformo, ligeramente soluble en agua, metanol, etanol y acetona, y muy poco soluble en acetato de etilo.

### 2.1.3.- **Mecanismo de acción**

Las moléculas de antibiótico penetran al interior de la célula bacteriana a través de las porinas y mediante un mecanismo activo de la membrana citoplasmática. El grado de penetración no está relacionado con la mayor o menor actividad antibacteriana ni con la concentración externa de moléculas de antibiótico<sup>63</sup>. Una vez dentro, se fijan a la ADN-girasa impidiendo -a concentraciones altas- la preparación del ADN para la transcripción, mientras que a bajas concentraciones se bloquea la replicación.

El mecanismo primario de acción de las quinolonas es la inhibición específica de la ADN-girasa bacteriana, -[topoisomerasa de tipo II formada por dos subunidades A (codificadas por el gen *gyr A*) y dos subunidades B (codificadas por el gen *gyr B*). Las primeras introducen puntos de rotura alternos en zigzag en los campos del ADN. Las segundas superenrollan los campos de ADN, y las subunidades A reconectan nuevamente los puntos de escisión del ADN]-<sup>64, 65</sup> evitando la reconexión de los puntos de escisión introducidos en el ADN por la unión de la quinolona a una de las bridas del ADN impidiendo la formación de los bucles de enrollamiento. Lo cual produce una expansión y desestabilización del ADN que no tendrá espacio suficiente en el interior de la célula bacteriana y junto con la producción de exonucleasas se producirá la muerte celular<sup>66-69</sup>.

Existe un segundo mecanismo de acción de las quinolonas no relacionado con el ARN ni con la síntesis proteica y que se ha demostrado con la adición de rifampicina, cloranfenicol y tiamfenicol a la concentración con mayor actividad de quinolona. Se ha visto que con la excepción de ciprofloxacino y ofloxacino, estos fármacos suprimen el efecto bactericida de las quinolonas, mientras que con ellos este efecto se reduce, pero no se suprime.

Por otro lado, todas las quinolonas tienen una curva de respuesta bifásica que condiciona que a concentraciones superiores a las óptimas que inhiben la síntesis de ARN se reduzca, hasta cierto punto, el efecto bactericida. Sin embargo, ofloxacino sólo presenta un 1% de supervivencia bacteriana por encima de sus concentraciones óptimas, en comparación con la supervivencia de más del 10% de otras quinolonas. Todo ello indica la existencia de una segunda acción de ofloxacino independiente del ARN<sup>67</sup>.

#### 2.1.4.- **Actividad antimicrobiana**

Tiene un amplio espectro antibacteriano que abarca a la mayoría de los gram negativos y a muchos cocos y bacilos gram positivos y algunos anaerobios.

Es muy activo frente a enterobacterias: especies de *Citrobacter*, *Enterobacter*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Morganella morganii*, *Proteus (mirabilis* y cepas indolpositivas)<sup>70</sup>, *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia enterocolitica*; especies de *Providencia* y *Serratia* son menos sensibles. Activo frente a especies de *Neisseria (gonorrhoeae* y *meningitidis)*, *Acinetobacter*<sup>71</sup>, y *Branhamella catarrhalis*<sup>72</sup>. Activo sobre especies de *Haemophilus (influenzae, parainfluenzae* y *ducrey)*<sup>73</sup>. También tiene actividad frente a *Pseudomona aeruginosa*<sup>70, 74</sup>, *Aeromonas* y *Plesiomonas*; sobre *Vibrio*, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*<sup>75-78</sup>. Activo frente a *Legionella pneumophila*<sup>79, 80</sup>, *Brucella*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* y *Fusobacterium*<sup>81</sup>.

Entre los gram positivos es activo frente a *S. aureus* y especies de *Staphylococcus coagulasa-negativas*<sup>74, 82</sup>. Presenta actividad variable frente a *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus hemolíticos*<sup>70</sup>. Activo sobre especies de *Bacillus* y *Corynebacterium*.

Es capaz de penetrar al interior celular y actuar sobre *Chlamydia trachomatis*<sup>83</sup>, *Chlamydia psittaci*, *Mycobacterium tuberculosis*<sup>84-86</sup>, *Mycobacterium fortuitum*,

*Mycobacterium kansasii* y *Mycoplasma pneumoniae*. Ofloxacino es el más activo de los inhibidores de la girasa frente a *Ureaplasma urealyticum*<sup>87</sup>.

Algunos microorganismos anaerobios, incluyendo *Prevotella melaninogénica*, *Bacteroides fragilis*<sup>70, 81, 88</sup> y *Clostridium welchi*<sup>89</sup> son moderadamente sensibles.

Es activo frente a muchas cepas resistentes a otros agentes antibacterianos, incluyendo a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Neisseria gonorrhoeae* resistente a penicilina y productora de beta-lactamasa, *Haemophilus influenzae* productor de beta-lactamasa, y una amplia gama de microorganismos resistentes a ampicilina y al ácido nalidixico<sup>90, 91</sup>. Tienen una sensibilidad variable *Streptococcus pneumoniae*, *Gardnerella vaginalis*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacteroides*, *Micobacterias* y *Chlamydia psittaci*. Y son normalmente resistentes *Clostridium difficile* y *Nocardia*<sup>76, 89</sup>.

### 2.1.5.- **Desarrollo de resistencias**

No se produce un desarrollo rápido de resistencia bacteriana a su acción<sup>92</sup>. No se han publicado resistencias mediadas por plásmidos, lo cual puede ser debido a que el mecanismo de acción de este antibiótico, que incluye la alteración del ADN bacteriano, hace muy poco probable este tipo de resistencia.

Tampoco están claros los mecanismos de resistencia. Se ha comentado que las alteraciones en las proteínas de la membrana externa podrían contribuir al desarrollo de resistencia a las quinolonas. Por ello, las resistencias de importancia clínica serán fundamentalmente cromosómicas, por la modificación de las subunidades A y B de la ADN-girasa en ciertas cepas de *E. coli*<sup>93, 94</sup>.

La incidencia de mutaciones puntuales espontáneas resistentes a concentraciones elevadas de quinolonas es baja. No obstante, se ha observado aparición de mutantes resistentes en monoterapia y en osteomielitis o infecciones broncopulmonares por *P. aeruginosa* o *Staphylococcus* en las que existe un gran número de microorganismos en lugares donde la penetración del antibiótico es limitada, o con cuerpos extraños<sup>95</sup>.

Sin embargo, *in vitro* es fácil seleccionar bacterias resistentes mediante cultivos sucesivos en concentraciones subinhibidoras de las mismas. Esto ocurre, particularmente, con *P. aeruginosa*, pero no con *E. coli*, y parece deberse a que *P. aeruginosa* precisa concentraciones más altas para inhibirse<sup>96-98</sup>.

Se ha descrito resistencia cruzada entre las quinolonas y entre quinolonas y otros antibióticos<sup>99-102</sup>.

#### 2.1.6.- **Indicaciones clínicas**

Varios estudios han mostrado el papel preventivo de ofloxacino en la endoftalmitis y en estudios de penetración intracamerular<sup>103, 104</sup> y la efectividad de otras quinolonas en las infecciones de la cámara anterior del ojo en humanos<sup>105</sup>. Siendo efectivas en el tratamiento de infecciones por *Enterobacteriaceae*, quizás ofloxacino, pefloxacino y fleroxacino sean más adecuadas para *Staphylococcus* y ciprofloxacino para *P. aeruginosa*. Aconsejando administrar las mas altas dosis permitidas después de determinar la CMI de cada cepa, sobre todo en el caso de las *Pseudomonas*<sup>106</sup>. Y se ha visto un grado de penetración intraocular en humor acuoso y vítreo similar para ofloxacino y ciprofloxacino que parecen ser algo más altos que los esperados con penicilinas y cefalosporinas<sup>103, 107, 108</sup>.

Ha mostrado su eficacia en pacientes con infecciones oftalmológicas. Oishi y Tokuda han encontrado buenos resultados con el uso de ofloxacino en el tratamiento de pacientes con blefaritis, meibonitis, orzuelos, conjuntivitis, dacriocistitis agudas y úlceras

corneales causadas, la mayoría de ellas, por *Staphylococcus* y señalaron una mayor resistencia de los *Streptococcus* al tratamiento<sup>108, 109</sup>.

### 2.1.7.- Farmacología ocular

El carácter dual lipo e hidrofílico de ofloxacino junto a su bajo PM que permite el paso del antibiótico por simple difusión a través de los espacios intercelulares y su baja unión a las proteínas de las lágrimas y de los exudados inflamatorios le hacen interesante en cuanto a su comportamiento en el transporte ocular. No se sabe si es eliminado activamente por la ruta retinal como los betalactámicos o pasivamente por la ruta anterior como los aminoglucósidos. Pero todo ello sugiere una mayor absorción y penetrabilidad ocular en la aplicación tópica, permitiendo alcanzar concentraciones elevadas en toda la córnea para el tratamiento de las infecciones oculares causadas por la mayoría de las bacterias comunes en ojos enfermos.

Las concentraciones de ofloxacino son más altas en los tejidos extraoculares que en los intraoculares, alcanzando en córnea concentraciones de 3-4 µg/g. Y ello está por encima de su CMI para la mayoría de los organismos gram positivos y negativos. En humor acuoso por vía IV 400 mg de ofloxacino consiguen mejores concentraciones (0'44-2'77 µg/ml) que la misma cantidad de ciprofloxacino (0'11-0'5 µg/ml) aunque por debajo de las encontradas con enoxacino (1'04-4'31 µg/ml)<sup>105, 106</sup>.

Por vía oral ofloxacino ha mostrado una alta utilidad clínica en el tratamiento de las enfermedades infecciosas de los ojos cuya causa principal bacteriana son los cocos gram positivos. Posee un efecto antibacteriano superior al ácido nalidíxico y al ácido pipemídico sobre aislados clínicos de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, siendo su CMI 4-5 veces más baja que la del ácido pipemídico para *P. aeruginosa*<sup>110-112</sup>.

En conejos la administración por vía oral de 20 mg/Kg de ofloxacino originó una mayor concentración en la córnea y mayor pico sérico que ciprofloxacino (50 mg/Kg) siendo las concentraciones en humor acuoso iguales. Frente a enoxacino (20 mg/Kg) se encontraron mayores concentraciones en la córnea, pero el pico sérico y la concentración en humor acuoso fueron equiparables. Y la distribución en los tejidos oculares externos fue casi la misma que la sérica<sup>105</sup>. Y así, con ofloxacino en la 1ª hora se hallaron concentraciones de 3'3-5'8 µg/ml en plasma, de 2'61 µg/ml en córnea y de 0'2-0'32 µg/ml en humor acuoso, siendo las concentraciones en la 4ª hora de 1'4 µg/ml en plasma y de 0'04 µg/ml en humor acuoso.

En humanos con una dosis oral de 200 mg se obtiene un pico sérico de 2'64 µg/ml con una vida media de 5 horas y una concentración en humor acuoso de 1'58 µg/ml<sup>109</sup>. Dosis de 300-600 mg/día durante dos semanas han demostrado una efectividad clínica global en infecciones externas de los ojos superior (94%) a la presentada por enoxacino y ciprofloxacino (80'8 y 79% respectivamente). Sobre las úlceras corneales la efectividad fue superior a la de enoxacino (50%), pero inferior (70%) a la de ciprofloxacino (100%)<sup>105, 113</sup>.

Estudios experimentales en conejos han obtenido concentraciones en las lágrimas superiores a la CMI 90 (2 µg/ml) de organismos gram positivos y gram negativos por más de 5 horas, con unos niveles en humor acuoso de 0'34 mg/l y un pico sérico de 5'8 mg/l tras la aplicación tópica de una solución de ofloxacino al 0'3%<sup>108, 114</sup>. También con colirio de lomefloxacino al 0'3% se han encontrado buenos resultados en el tratamiento de queratitis por *S. epidermidis* y *P. aeruginosa*.

En humanos la instilación por 4 horas de colirio de ofloxacino al 0'3% ha revelado concentraciones en las lágrimas de 1'2-22'2 µg/ml con una media de 9'6 ± 8'24 ES, durante el tiempo en que se realizan las mediciones<sup>115</sup>. Por otro lado, un estudio que aplicó 1 gota de ofloxacino al 0'3% en cada ojo cada 6 horas durante 10 días, mostró un rango de concentración en las lágrimas de 2'25-66'6 µg/g entre 5 a 40' tras la dosis (n = 5). Pese a la variabilidad encontrada en la aplicación tópica, estos valores se consideran más altos que la

CMI de ofloxacino para la mayoría de los patógenos oculares. Las concentraciones en suero (0'42-1'63 ng/ml) a los 10 días indicaron una absorción sistémica baja, aproximadamente 1.000 veces menor que el nivel esperado tras una dosis oral de 300 mg (1 µg/ml)<sup>116</sup>.

#### 2.1.8.- **Interacciones bacteriológicas**

Se ha descrito sinergia *in vitro* cuando se asocia con rifampicina o isoniacida frente a *Mycobacterium tuberculosis*<sup>117</sup>. Sinergia frente a *S. aureus* e indiferencia frente a *S. epidermidis* al combinarlo con cumermicina<sup>118</sup>. Rifampicina y cloranfenicol antagonizan la actividad de ofloxacino frente a *E. coli*<sup>66</sup>. Sin embargo, presentan indiferencia frente a *Pseudomona cepacia*<sup>119</sup>.

#### 2.1.9.- **Toxicidad y efectos secundarios**

No tiene actividad lesiva contra el epitelio corneal, aunque se ha descrito ardor o escozor local tras su administración<sup>120, 121</sup>.

#### 2.1.10.- **Contraindicaciones**

Hipersensibilidad a las 4-quinolonas.

## 2.2.- TIAMFENICOL

Sintetizado por Cutler y cols.<sup>122</sup> en 1952. Estrictamente bacteriostático *in vitro* e *in vivo*, de amplio espectro, actúa inhibiendo la síntesis proteica de las bacterias.

### 2.2.1.- Estructura química

Análogo químico del cloranfenicol<sup>123, 124</sup>, en el cual el grupo nitro en posición *para* en el anillo bencénico ha sido sustituido por un grupo sulfometil, lo que le confiere mayor solubilidad y estabilidad en las soluciones y menor toxicidad hematológica que el cloranfenicol<sup>125-127</sup>.

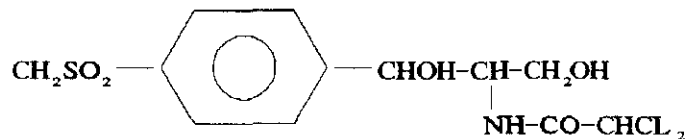


Fig. 2: Estructura química de tiamfenicol.

### 2.2.2.- Propiedades físico-químicas

Cristales blancoamarillentos o incoloros, de sabor amargo, poco soluble en agua salvo en forma de glicinato, muy soluble en propilenglicol, etanol y butanol. La solución acuosa es muy estable a pH 5, pudiendo dejarse indefinidamente a temperatura ambiente. Puede ser administrado por vía parenteral o tópica sin provocar dolor ni reacciones locales o generales.

### 2.2.3. - **Mecanismo de acción**

Se une de forma reversible a la subunidad 50 S ribosomal (cerca del lugar de acción de los macrólidos y de la clindamicina, a la cual inhibe de forma competitiva) interrumpiendo, específicamente, la fijación de la parte terminal de los sustratos aminoacil-ARN-transportadores al sitio aceptor de la peptidil-transferasa<sup>128</sup>, con lo que bloquea la biosíntesis de proteínas bacterianas<sup>129</sup>, en el paso concreto de la formación del enlace peptídico<sup>130, 131</sup>. La exposición de una bacteria sensible a este antibiótico causa, pues, el cese inmediato de la síntesis de las proteínas pero no de los ácidos nucleicos<sup>132</sup>.

### 2.2.4. - **Actividad antimicrobiana**

Es activo sobre cocos gram positivos (*Staphylococcus spp.*, *Streptococcus* alfa y beta hemolíticos, *S. faecalis* y *S. pneumoniae*) y sobre gram negativos (*Neisseria meningitidis* y *gonorrhoeae*). Su espectro de actividad se extiende a bacilos gram positivos (*Corynebacterium*, *Bacillus anthracis* y *Listeria monocytogenes*), y gram negativos (*Haemophilus*, *Bordetella*, *Brucella*, *Pasteurella* y *Yersinia*). Activo sobre un gran número de enterobacterias y especialmente sobre todo tipo de salmonelas. Actúa también sobre espiroquetas (tanto treponemas como leptospiras), y sobre rickettsias, clamidias, micoplasmas y actinomicas.

Muy activo sobre los anaerobios gram positivos (*Clostridium* y cocos) como gram negativos (*Bacteroides* o *Fusobacterium*), siendo para algunos autores de elección en las infecciones causadas por estos microorganismos antes de conocer el antibiograma<sup>133</sup>, y considerándose de los agentes más activos contra ellos<sup>134</sup>.

### 2.2.5.- **Desarrollo de resistencias**

Puede ser cromosómica, por impermeabilidad de la célula bacteriana al antibiótico y extracromosómica, debido a la acetilación por acetil-transferasas codificadas por un plásmido. La acetil-transferasa parece ser constitutiva en *E. coli* y *Proteus mirabilis* e inducible en *Staphylococcus coagulasa* positivo y negativo<sup>135</sup>.

### 2.2.6.- **Indicaciones clínicas**

Puede reemplazar completamente al cloranfenicol en sus diversos usos clínicos<sup>136</sup>. Es pues, una alternativa terapéutica para las infecciones bacterianas agudas externas del ojo causadas por *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* o *S. viridans* e infecciones estafilocócicas por cepas resistentes a penicilinas en donde existe una indicación clara y absolutamente necesaria de cloranfenicol.

### 2.2.7.- **Farmacología ocular**

Su liposolubilidad y menor PM que ofloxacino y aminoglucósidos facilitan la penetración y difusión intracorneal. Su absorción rápida y extensa con muy baja unión a proteínas plasmáticas (5-10%) y una vida media larga de 3 horas, permite obtener altos niveles séricos por encima de la CMI de la mayoría de los gérmenes sensibles, cualquiera que sea la vía de administración (oral, IM, IV), con unas concentraciones en humor acuoso que son el 30-50% de las séricas<sup>137</sup>.

Estudios previos *in vitro* en córneas de cerdo<sup>137</sup> han puesto de manifiesto la buena absorción del tiamfenicol (TP) a través de la córnea, alcanzando niveles en humor acuoso que se detectan por largo tiempo.

En conejos, la administración oral de 200 mg/Kg origina unos niveles en humor acuoso de 5 µg/ml a la hora que se van incrementando conforme pasa el tiempo siendo de 9'6 µg/ml en la 4ª hora y de 14 µg/ml en la 6ª hora y no detectándose a las 10 horas.

En humanos dosis IM de 750 mg consiguen una buena penetración ocular con concentraciones elevadas de 2'4 µg/ml a las 4 horas y de 1'7 µg/ml a las 6 horas de su administración<sup>138</sup>. Dosis de 1'5 g/IM ó IV consiguen concentraciones séricas medias de 10-11 µg/ml a la hora que descienden a 2 µg/ml en la sexta hora con una vida media de 1'5 horas. Por vía oral 1 g alcanza un pico sérico de 6'25 µg/ml entre 1'5 y 2 horas con un máximo entre la 2ª y la 4ª hora, y con una segunda dosis se alcanzan concentraciones séricas de 12'5 µg/ml.

La aplicación tópica de colirio de tiamfenicol al 0'5% penetra rápidamente en la córnea, alcanzando un pico en humor acuoso de  $110'2 \pm 24$  ng/ml a los 45 minutos y permanece a una concentración de  $35'4 \pm 5'4$  ng/ml a las 4 horas. La buena absorción ocular del tiamfenicol se ha confirmado por las concentraciones observadas en plasma tras la instilación, con una concentración máxima de  $12'3 \pm 1'3$  ng/ml a la hora de la instilación. La disminución de las concentraciones del tiamfenicol es lenta con valores de  $2'9 \pm 0'2$  ng/ml a las 4 horas.

Estas concentraciones alcanzadas en el plasma tras la instilación ocular son 1.000 veces inferiores a las alcanzadas con dosis habituales por vía endovenosa usadas en las enfermedades infecciosas. El AUC tras el tratamiento tópico es aproximadamente 600 veces más bajo que el obtenido con el tratamiento endovenoso. La biodisponibilidad ocular absoluta fue del 16'2% cuando se halló el AUC y del 34% de los valores de la excreción urinaria, permitiendo excluir la toxicidad sistémica del tiamfenicol en colirio<sup>137</sup>.

### 2.2.8.- **Interacciones bacteriológicas**

Puede existir antagonismo con aminoglucósidos<sup>139, 140</sup>, macrólidos y lincosamidas y, en términos generales, con penicilinas y cefalosporinas.

### 2.2.9.- **Toxicidad y efectos secundarios**

No se ha descrito toxicidad sistémica del tiamfenicol en solución al 0'5% por vía tópica en oftalmología<sup>137</sup>. No obstante, se aconseja no prolongar los tratamientos mas de 14 días.

Se ha descrito un caso de aplasia medular total irreversible después del tratamiento con tiamfenicol a dosis de 750 mg/día en semanas alternas durante 6 meses<sup>141</sup>. Por ello, cuando se use en oftalmología por vía sistémica deben hacerse controles de recuento sanguíneo para evitar agranulocitosis.

### 2.2.10.- **Contraindicaciones**

Hipersensibilidad a tiamfenicol, deficiencias hematopoyéticas.

## 2.3.- RIFAMPICINA

Antibiótico semisintético de la familia de las rifamicinas, descubiertas por Sensi y cols.<sup>142</sup> en 1957. Bactericida, de amplio espectro, actúa inhibiendo la síntesis del ADN bacteriano durante la fase de crecimiento.

### 2.3.1.- Estructura química

Presenta una estructura macrocíclica compleja compuesta de dos partes: un núcleo naftoquinona (1,4-dihidronaftaleno) y una cadena alifática con cinco grupos metilo que, a modo de puente, une dos extremos del ciclo naftoquinónico.

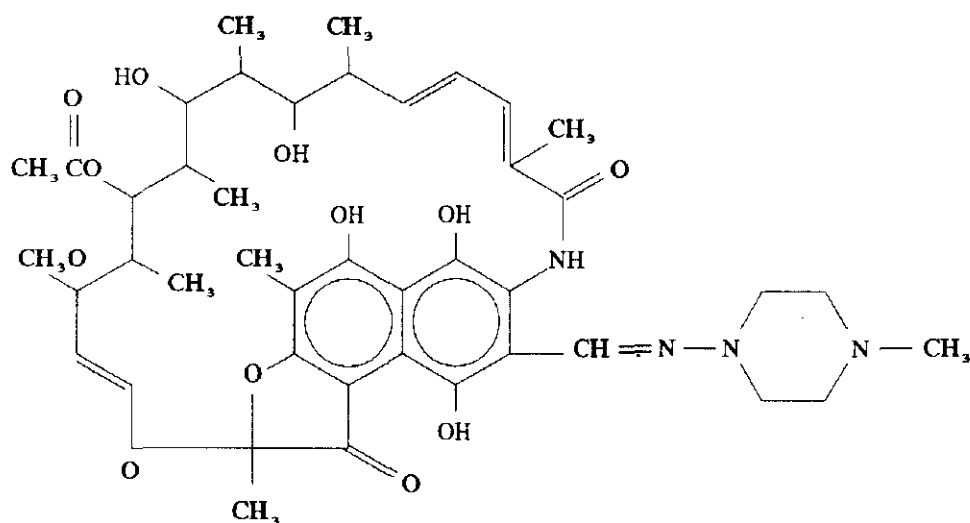


Fig. 3: Estructura química de rifampicina.

### 2.3.2.- **Propiedades físico-químicas**

Cristales rojoanaranjados, poco hidrosoluble salvo a pH ácido, soluble en disolventes orgánicos como acetona, metanol, etanol, etc., liposoluble. Presenta fotosensibilidad por lo que debe ser resguardado de la luz.

### 2.3.3.- **Mecanismo de acción**

Inhibe la síntesis del ADN bacteriano al unirse a la ARN-polimerasa al inicio de la transcripción, antes de la formación del primer enlace nucleotídico<sup>129</sup>, bien porque inhibe competitivamente la unión o porque interfiere con el alineamiento correcto de la ARN-polimerasa en relación con el ADN bacteriano.

No tiene acción sobre la ARN-polimerasa eucariótica, pero al poder penetrar en su interior, resulta activa sobre microorganismos intracelulares (*M. tuberculosis*, *Brucella*, etc.)<sup>143</sup>.

Ejerce su acción bactericida sobre organismos sensibles que se encuentran en fase de crecimiento.

### 2.3.4.- **Actividad antimicrobiana**

Es activa sobre cocos gram positivos (*Staphylococcus spp.*, *Streptococcus* alfa y beta hemolíticos, incluido el *S. pneumoniae*, siendo inefectiva frente al *S. faecalis*) y sobre gram negativos (*Neisseria meningitidis* y *gonorrhoeae*). Su espectro de actividad se extiende a bacilos gram positivos (*Corynebacterium diphtheriae*, *Bacillus anthracis*, *Listeria monocytogenes* y *Clostridium*)<sup>144</sup>.

Presenta escasa actividad frente a bacilos gram negativos aerobios, aunque, desde el punto de vista de su actividad *in vitro*, puedan incluirse en su espectro a *Brucella*, *Haemophilus* y cepas de *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella*, *Shigella* y *Moraxella*. *Pseudomonas pseudomallei* es habitualmente sensible<sup>145</sup>.

Activa sobre bacilos gram negativos anaerobios estrictos (*Bacteroides* y algunas especies de *Fusobacterium*). Activa *in vivo* frente a leishmanias. No presenta actividad frente a espiroquetas, micoplasmas, resto de protozoos y hongos, a excepción de *Actinomyces naeslundii*. Activa sobre *Chlamydia trachomatis*.

Muy activa frente a micobacterias, incluyendo a *M. tuberculosis*, micobacterias atípicas y *M. leprae*.

Presenta actividad sobre algunos virus que poseen ADN e inducen ARN-polimerasas, como adenovirus y poxvirus (vacuna).

### 2.3.5.- Desarrollo de resistencias

Se han descrito cuatro tipos de resistencia: 1) Cromosómica de tipo facultativo en uno o varios escalones (*E. coli*). 2) Cromosómica tipo estreptomicina en un sólo escalón (*Staphylococcus*) y con una tasa de mutantes elevada, pudiendo aparecer la resistencia en el curso del tratamiento. 3) Cromosómica tipo penicilina en varios escalones (micobacterias), con una tasa de mutantes baja. 4) Extracromosómica por factores *R* en bacilos gram negativos<sup>144</sup>.

No presenta resistencia cruzada con otros antibióticos, excepto con las demás rifamicinas.

### 2.3.6.- **Indicaciones clínicas**

En solución acuosa al 1% con la sal sódica de rifamicina SV está indicada en el tratamiento de las infecciones oculares causadas por gérmenes sensibles, fundamentalmente cocos gram positivos<sup>144, 146</sup>, y así ha probado su eficacia en el tratamiento de conjuntivitis bacterianas agudas, subagudas y crónicas, en blefaritis infectadas y dacriocistitis supuradas.

También se ha recomendado su uso en la profilaxis de las infecciones quirúrgicas<sup>146</sup> y en la limpieza del polo anterior ocular después de las múltiples exploraciones que se realizan en la práctica diaria oftalmológica.

### 2.3.7.- **Farmacología ocular**

Presenta una buena absorción y penetrabilidad ocular en la aplicación tópica al ser ácido estable, lo cual le confiere una mayor hidrosolubilidad corneal, aunque su difusión simple a través de los espacios intercelulares se vea interferida por su alto PM y su también elevado porcentaje de unión a las proteínas. La vida media es de unas 3 horas<sup>136</sup>.

La administración de una dosis única oral en el adulto de 0'6 g de rifampicina (RA) origina una concentración sérica máxima de 8-10 mcg/ml a las 4 horas, alcanzando concentraciones mayores a la sérica en las glándulas lacrimales y lágrimas que se pueden pigmentar de un tinte rojoanaranjado por la presencia del antibiótico o sus metabolitos activos en ellas. En LCR alcanza entre un 3 y un 8% de los valores séricos, aumentando este valor en caso de inflamación de la barrera hematoencefálica<sup>147</sup>.

### 2.3.8.- **Interacciones bacteriológicas**

*In vitro* puede ser antagónica con betalactámicos, ácido nalidíxico y nitrofurantoína. Sinérgica con aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas, polimixinas, vancomicina y virginiamicina. Puede potenciar el efecto antimicótico de la anfotericina B y de la 5-fluorocitosina frente a los hongos levaduriformes<sup>144</sup>.

### 2.3.9.- **Toxicidad y efectos secundarios**

Se ha visto irritación conjuntival y pigmentación rojoanaranjada transitoria tras su aplicación local. Se han descrito algunas reacciones alérgicas.

### 2.3.10.- **Contraindicaciones**

Hipersensibilidad a rifamicinas.

## 2.4.- AMINOGLUCÓSIDOS: GENTAMICINA - TOBRAMICINA.

Antibióticos naturales o semisintéticos, primariamente bactericidas (a excepción de espectinomina), de amplio espectro, actúan inhibiendo la síntesis proteica de las bacterias sensibles durante la fase de crecimiento.

Gentamicina (GM) procede del actinomiceto *Micromonospora*, estudiada y descrita por primera vez por Weinstein y cols. en 1963, fue aislada, purificada y caracterizada por Rosselot y cols.<sup>148</sup> en 1964.

Tobramicina (NN) fue introducida en la práctica clínica en los años 70, producida por *Streptomyces tenebrarius*<sup>149</sup>. Su actividad antimicrobiana y su toxicidad son muy semejantes a gentamicina. Ambos poseen un espectro de acción más amplio que kanamicina.

### 2.4.1.- Estructura química

Son azúcares amino-sustituidos unidos a un anillo aminociclitol mediante enlaces glicosídicos, con la excepción de espectinomina que se considera un aminociclitol puro. Tanto gentamicina como tobramicina poseen un núcleo central 2-deoxiestreptamina unido en posición 4-6 a dos aminohexosas que serán garosaminas o kanosaminas según se trate de una u otra. Las fracciones más importantes de gentamicina son C<sub>1A</sub> y C<sub>2</sub>.

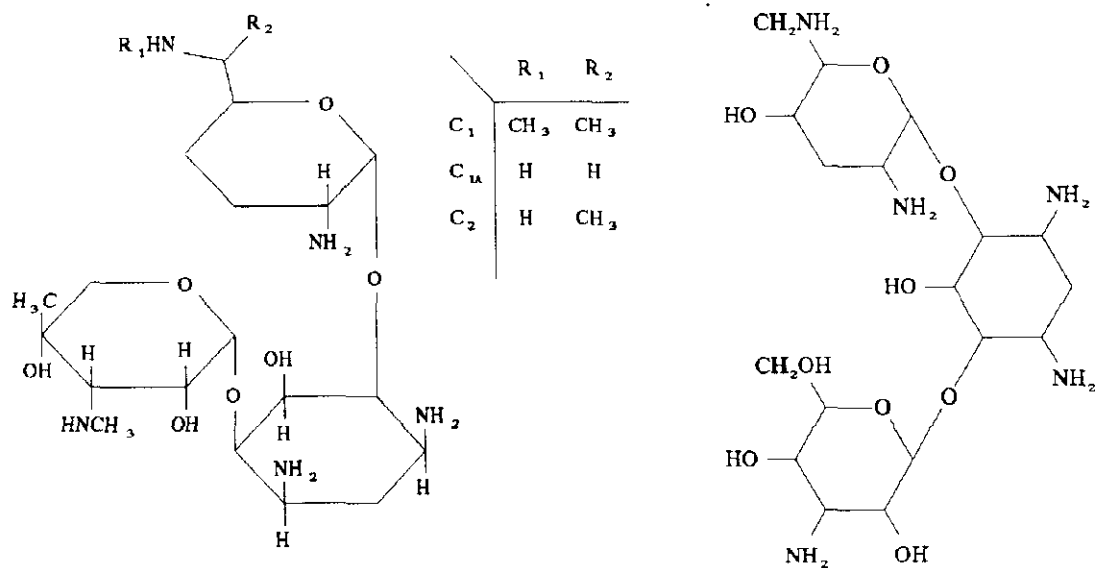


Fig. 4: Estructura química de gentamicina y tobramicina.

#### 2.4.2.- Propiedades físico-químicas

Polvos blancos o amarillentos, inodoros, higroscópicos pero estables en solución y resistentes a los cambios de pH (2 a 14). Hidrosolubles, son poco solubles en disolventes orgánicos. Son estables durante al menos 24 horas a temperatura ambiente, en solución de glucosa al 5% o de cloruro sódico al 0.9%. Son policationes y su polaridad es responsable de sus características farmacocinéticas.

#### 2.4.3.- Mecanismo de acción

Se unen a la subunidad 30 S del ribosoma en cualquiera de las fases de iniciación, elongación o terminación de la síntesis proteica. Además, parecen unirse a varios sitios de la subunidad ribosómica 50 S<sup>150</sup>.

Interfieren con la iniciación de la síntesis de proteínas llevando a la acumulación de

complejos anormales de iniciación<sup>151</sup>. Pueden inducir una lectura errónea del ARNm, dando lugar a la incorporación de aminoácidos incorrectos a las cadenas polipeptídicas en formación<sup>152, 153</sup>. Además, a altas concentraciones producen alteraciones en la pared bacteriana.

#### 2.4.4.- Actividad antimicrobiana

Activos frente a bacilos aerobios gram negativos: *E. coli*, *Proteus spp.*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* y *Pseudomonas aeruginosa*. Amikacina y netilmicina son también activas contra algunas cepas de *Acinetobacter*. Son relativamente poco eficaces frente a *Pseudomonas cepacia* y *Pseudomonas maltophilia*<sup>154</sup>. Tienen poca actividad sobre microorganismos anaerobios o bacterias facultativas en condiciones de anaerobiosis. Activos frente a *Staphylococcus*, su acción contra la mayoría de las bacterias gram positivas es limitada, siendo altamente resistentes el *S. pneumoniae* y el *S. pyogenes*.

En general, gentamicina y tobramicina son más activos que kanamicina. Son activas *in vitro* contra más del 90% de las cepas de *S. aureus* y el 75% de *S. epidermidis*, siéndolo mucho menos frente al *S. pneumoniae* y resto de *Streptococcus* y, habitualmente, resistentes al *S. faecalis*. La resistencia primaria a gentamicina en las enterobacterias y estafilococos es rara. Se ha hecho más frecuente en los hospitales y con cepas de *P. aeruginosa* y *Serratia*. El desarrollo de resistencias durante el tratamiento es extremadamente raro. Puede existir resistencia cruzada con la casi totalidad de los aminoglucósidos.

Tienen una actividad similar contra la mayoría de los bacilos gram negativos, aunque tobramicina suele ser más activa contra *P. aeruginosa* y frente a algunas cepas de especies de *Proteus*. La mayoría de los bacilos gram negativos (excepto *P. aeruginosa*) que son resistentes a gentamicina lo son también a tobramicina. Sin embargo, permanecen sensibles a tobramicina alrededor del 50% de *P. aeruginosa* que presentan resistencia a gentamicina<sup>155</sup>.

#### 2.4.5.- Desarrollo de resistencias

Puede ser de 3 clases:

1) Cromosómica por mutaciones que afectan a las proteínas del ribosoma bacteriano en las que se fija el aminoglucósido. Tiene poca importancia clínica.

2) Extracromosómica por la adquisición de factores de resistencia que codifican gran número de enzimas modificantes de aminoglucósidos, que catalizan acetiltransferasas (AAC), fosfotransferasas (APH), adeniltransferasas (AAD) o nucleotidiltransferasas (ANT). Aparece sobre todo en los medios hospitalarios y sobre *Pseudomonas spp.*, *S. marcescens*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae* y *S. aureus*. Ha reducido la utilidad clínica de kanamicina y, últimamente, de gentamicina, tobramicina/netilmicina y amikacina, por este orden. Estos plásmidos pueden diseminar resistencia a otros antibióticos en forma simultánea<sup>156</sup>.

3) Impermeabilidad de la pared y membrana celular al paso del antibiótico a través de los poros de la membrana externa de los microorganismos gram negativos dentro del espacio periplásmico. Presentan resistencia cruzada a todos los aminoglucósidos, aunque los niveles de resistencia no son muy elevados. El mecanismo íntimo de esta resistencia es la mutación. En el caso de microorganismos anaerobios o aerobios facultativos en condiciones de anaerobiosis, existe una resistencia natural al paso del fármaco a través de la membrana citoplásmica interna por ser un proceso oxígeno-dependiente<sup>157</sup>.

#### 2.4.6.- Indicaciones clínicas

En general todos los aminoglucósidos son nefrotóxicos y ototóxicos. Su naturaleza catiónica altamente polar dificulta la penetración ocular, pudiéndose afirmar que cuando son administrados por vía sistémica se consiguen concentraciones tóxicas en plasma antes

de conseguir niveles terapéuticos en el ojo. Por tanto, sus indicaciones en oftalmología son para la administración por vía tópica.

Gentamicina es el agente preferido para la mayoría de las indicaciones por la larga experiencia con su uso. Puede utilizarse en el tratamiento de infecciones bacterianas superficiales y profundas de los ojos producidas por bacilos gram negativos y cocos gram positivos sensibles.

Las indicaciones de uso de tobramicina son superponibles en esencia a los de la gentamicina. Tiene mayor actividad sobre *P. aeruginosa*, y ello la hace conveniente para el tratamiento de queratitis y endoftalmitis causadas por especies de *Pseudomonas*. Además, parece alcanzar mejores niveles en humor acuoso<sup>158</sup>.

Ambas han probado una eficacia similar en el tratamiento de las infecciones superficiales y profundas del ojo y sus anejos causadas por gérmenes sensibles: úlceras y abscesos corneales bacterianos, conjuntivitis, queratitis, endoftalmitis, estafilococias, blefaritis, dacriocistitis<sup>158, 159</sup>.

También se ha indicado su uso en la esterilización preoperatoria de la conjuntiva.

#### 2.4.7.- **Farmacología ocular**

El mayor obstáculo a la penetrabilidad de los aminoglucósidos por vía tópica cuando la barrera corneal está intacta se ha atribuido a su poca liposolubilidad<sup>160-165</sup>. No obstante, cuando existe desepitelización, el bajo PM y la baja unión a proteínas (< 5% para gentamicina y entre 5-30% para tobramicina) facilitan la difusión a través de los espacios intercelulares permitiendo la circulación de suficiente fármaco libre activo.

Por vía parenteral consiguen una penetración en los líquidos oculares tan deficiente que el tratamiento efectivo de la endoftalmitis bacteriana requiere inyecciones periorbitales, y ello se ha atribuido a su naturaleza polar que excluye en su difusión por el organismo a la mayoría del SNC y del globo ocular<sup>158</sup>.

Y así, en humanos, dosis IM o IV de 1'5 mg/Kg de gentamicina o tobramicina consiguen un pico sérico de 5-8  $\mu\text{g/ml}$  a los 30-60 minutos con una vida media entre 1'5 y 2 horas. Con dosis única IM de 1 mg/Kg de gentamicina se alcanza en córnea 6'1  $\mu\text{g/g}$  y en humor acuoso 0'4  $\mu\text{g/g}$ . Dosis IM de 1'5 mg/Kg de tobramicina consiguen una concentración en córnea de sólo 0'2  $\mu\text{g/ml}$  y en humor acuoso 1'3  $\mu\text{g/ml}$ <sup>166</sup>.

La aplicación tópica de colirio de gentamicina al 0'3% en conejos consigue una concentración en lágrimas que supera la CMI 90 de la mayoría de los organismos gram negativos (8  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 2 horas y gram positivos (16  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 20 minutos<sup>114</sup>.

En humanos, el uso de preparaciones fortificadas de 13'6 mg/ml aumenta considerablemente la eficacia, consiguiendo concentraciones en córnea de 16'2  $\mu\text{g/g}$  que superan por 3 veces las concentraciones corneales obtenidas por la vía parenteral<sup>167, 168</sup>. Aunque los estudios muestran que se puede usar gentamicina 1 mg/Kg por vía IM para encontrar niveles adecuados en la córnea, ello exige más antibiótico y efectos potencialmente tóxicos y secundarios.

La aplicación tópica de colirio de tobramicina al 0'3% en conejos consigue una concentración en lágrimas (16  $\mu\text{g/ml}$ ) que supera la CMI 90 de la mayoría de los organismos gram negativos (incluida *P. aeruginosa*) y positivos durante 10 minutos<sup>114</sup>. En experimentación animal se detecta un pico de 2-3  $\mu\text{g/ml}$  en humor acuoso después de 1-2 horas tras la inyección parenteral de tobramicina.

En humanos, el uso frecuente de preparaciones fortificadas puede producir concentraciones en córnea de 100  $\mu\text{g/ml}$ <sup>163</sup>.

#### 2.4.8.- **Toxicidad y efectos secundarios**

La frecuencia de reacciones adversas asociadas al uso de colirios de gentamicina y tobramicina al 0'3% es similar<sup>158</sup>. Con ambos se han descrito reacciones de alergia que obligan a la interrupción del tratamiento.

La aplicación tópica de gentamicina se ha asociado con irritación, dolor, picor y ardor. También con tobramicina se ha descrito epífora leve y reversible, quemazón, fotofobia, edema palpebral, eritema y quemosis conjuntival, y erosiones puntiformes del epitelio que en algunos casos aconsejan la interrupción del tratamiento. En cualquier caso, no se han descrito lesiones permanentes<sup>169</sup>.

Por vía subconjuntival ambos son bien tolerados por los tejidos oculares. En inyección intravítrea dosis superiores a 0'4 mg pueden producir degeneración de la retina<sup>170</sup>. La toxicidad del epitelio corneal se ha correlacionado con la cantidad total de fármaco administrado y con la duración del tratamiento. Así pues, son dosis, concentración y frecuencia dependientes<sup>171</sup>.

#### 2.4.9.- **Interacciones bacteriológicas**

Pueden presentar sinergia con betalactámicos, fosfomicina, ácido pipemídico, macrólidos y rifamicinas. Se ha descrito sinergia en la asociación de los aminoglucósidos entre sí y de éstos con vancomicina, pero no se recomienda su uso por la posibilidad de potenciar los respectivos efectos tóxicos.

Gentamicina tiene una interacción muy favorable frente a cepas de *P. aeruginosa* con azlocilina, piperacilina y cefotaxima. Tiene sinergismo con ampicilina frente a enterococos y con las cefalosporinas frente a *Klebsiella*.

En contraposición a gentamicina, tobramicina tiene poca actividad en combinación con penicilina frente a los enterococos; un elevado porcentaje de cepas de *Enterococcus faecium* es altamente resistente<sup>172</sup>. Tobramicina suele utilizarse conjuntamente con una penicilina antipseudomonas, aztreonam o ceftazidima.

#### 2.4.10.- **Contraindicaciones**

Hipersensibilidad a gentamicina y tobramicina.

### 3.- **EFEECTO POSTANTIBIÓTICO**

El fenómeno del efecto postantibiótico se describió por primera vez en 1944 por Bigger<sup>173</sup>, que observó un retraso en el desarrollo de la turbidez en cultivos de *Streptococcus* y *Staphylococcus* a los que había añadido penicilasa, después de haberlos expuesto, con anterioridad, a penicilina. En 1946 Parker y Marsh<sup>174</sup> y en 1948 Parker y Luse<sup>175</sup> observaron un retraso de varias horas en la multiplicación de cepas de *Staphylococcus*, cuando después de exponerlas a la acción de la penicilina por un período de tiempo determinado, las transferían a un medio sin antibiótico.

En 1950 y 1953 Eagle y cols.<sup>176-178</sup> demostraron *in vivo* que cepas de *S. pneumoniae* y *S. pyogenes* no reanudaban su crecimiento normal hasta transcurridas cuatro horas después de su exposición a la penicilina G.

En los años 70 son importantes los trabajos de Bodey y Pan<sup>179</sup> en 1976, los de McDonald, Craig y Kunin<sup>8</sup> en 1977, y los de Wilson y Rolinson<sup>180</sup> en 1979. Es en esta década cuando los estudios se extienden al resto de los antimicrobianos y a bacterias gram negativas y así, durante los años 80 y primeros años de los 90 las publicaciones sobre este fenómeno *in vitro* e *in vivo* confirman su existencia para todos los antimicrobianos y organismos, siendo los resultados variables en función del antimicrobiano, el microorganismo y las condiciones experimentales.

#### 3.1.- **DEFINICIÓN**

Se denomina EPA al período de tiempo que precisan las bacterias para recuperar su crecimiento normal después de ser expuestas durante un tiempo determinado a la acción de un agente antimicrobiano.

Es un fenómeno que se ha asociado a la actividad inhibitoria de los antibióticos y se produce cuando éstos se ensayan a concentraciones que se aproximan o superan la concentración mínima inhibitoria<sup>181, 182</sup>, y es debido a la exposición previa al antimicrobiano y no a la persistencia de concentraciones subinhibitorias del fármaco<sup>183</sup>.

### 3.2.- MECANISMOS DEL EPA

No se conocen los mecanismos exactos por los cuales los antimicrobianos inducen EPA. Las diferencias observadas en los EPA de varias combinaciones de antimicrobiano/microorganismo sugieren la implicación de múltiples mecanismos. Las hipótesis más aceptadas son las que hablan acerca de la persistencia limitada en el tiempo del antimicrobiano en el sitio de unión a la bacteria y las de la provocación por el antimicrobiano de daños no letales en las bacterias, que originarían un retraso en su crecimiento normal.

Las quinolonas, al inhibir la acción de la ADN-girasa bacteriana, impiden el superenrollamiento negativo del ADN bacteriano, provocando un bloqueo en el paso de la ADN o ARN polimerasa, y el EPA sería el tiempo necesario para la disociación del antimicrobiano del complejo ADN-girasa y la reparación del ADN.

Los aminoglucósidos se unen de forma irreversible a la subunidad 30 S de los ribosomas, impidiendo la síntesis proteica, y el EPA se explicaría como el tiempo necesario para la síntesis de nuevos ribosomas, representando así, una forma de daño no letal<sup>4, 5, 181, 184</sup>.

Antimicrobianos como eritromicina, tetraciclina y cloranfenicol se unen reversiblemente a la subunidad 50 S ribosomal<sup>185</sup> y su mecanismo de inducción del EPA sería similar al de los aminoglucósidos, representando el tiempo necesario por el antibiótico para difundir fuera de los ribosomas. Sin embargo, hay estudios que hablan de otros

mecanismos<sup>181, 184, 186</sup>. Gerber y Craig<sup>187</sup> observaron *in vitro* no pérdida del EPA para eritromicina con *S. pneumoniae* después de 24 horas a 4°C; durante este tiempo el antibiótico esperaría para difundir desde los ribosomas e incluso fuera del ribosoma.

Los betalactámicos se unen covalentemente a las proteínas fijadoras de penicilinas (PBPs), algunas de las cuales actúan en la síntesis del péptidoglicano de la pared celular<sup>188</sup>. Se ha sugerido que el EPA sería el tiempo que necesita la célula para sintetizar de nuevo estas proteínas o el necesario para la disociación del complejo PBP-antimicrobiano<sup>181</sup>.

Cada betalactámico posee una o varias PBPs específicas donde actuar en cada especie bacteriana. La vida media del complejo enzima-penicilina varía según la especie bacteriana y antibiótico, regenerándose la actividad enzimática molecular<sup>189-191</sup>. La rápida y espontánea liberación de penicilina por una proteína de bajo peso molecular y de vida media menor o igual a 10 minutos en bacilos, pero no en cocos<sup>190, 192</sup>, podría explicar la ausencia de EPA para betalactámicos con bacilos gram negativos. De esta forma, las diferencias en los EPA de betalactámicos podrían representar diferencias en la proporción de penicilina liberada y en las tasas de regeneración de las moléculas enzimáticamente activas después de eliminar el antimicrobiano del medio. Sin embargo, los carbapenemas presentan EPA significativos frente a gram negativos<sup>181, 193-195</sup>.

Con respecto a los agentes antifúngicos, 5-fluorocitosina interfiere con la síntesis de ácidos nucleicos y probablemente induce EPA por mecanismos similares a los de rifampicina. Anfotericina B induce desestabilización de la membrana celular por unión a los esteroides<sup>196</sup> y el EPA sería el tiempo necesario para reparar la membrana antes de que la activación brotara y la multiplicación ocurriese.

Con los imidazoles en un principio se pensó que actuaban a través de daños en la membrana, por alteración en la biosíntesis de esteroides<sup>196</sup>. Sin embargo, este efecto ocurría solamente a las concentraciones de fármaco más altas que aquéllas observadas para la actividad *in vitro*. Estudios posteriores señalan los efectos potentes sobre el metabolismo

oxidativo mitocondrial, a través de la inhibición del citocromo C oxidasa<sup>197, 198</sup>. La falta de EPA con los imidazoles es consecuente con un alto grado de reversibilidad a este antagonismo.

### 3.3.- MÉTODOS DE DETERMINACIÓN

Se han utilizado varios modelos *in vitro* e *in vivo* para determinar el EPA. Todos miden el crecimiento bacteriano después de la eliminación del antimicrobiano<sup>181</sup>. La diferencia entre ellos se encuentra en la forma de medir el crecimiento de las bacterias y en la forma de eliminar el antibiótico.

Los métodos empleados para medir la cinética bacteriana, fundamentalmente, son tres: 1) El recuento de células viables<sup>179, 182</sup>. 2) Los cambios en la morfología celular<sup>199</sup>. 3) La medida de la población bacteriana de manera indirecta por medio de diversas técnicas como son: la bioluminiscencia del ATP intracelular<sup>200-202</sup>, la espectrofotometría o detección del crecimiento bacteriano por la transmisión de luz<sup>203, 204</sup>, la conductancia eléctrica del medio<sup>193, 205</sup>, la producción de CO<sub>2</sub> en el medio<sup>206</sup> y la incorporación de isótopos radioactivos a los microorganismos<sup>207, 208</sup>.

En cuanto a la forma de eliminación del antimicrobiano, la mayoría de los investigadores han utilizado técnicas de eliminación rápida del antibiótico mediante centrifugación y lavados repetidos<sup>179, 182, 209</sup>, dilución de 100 a 1000 veces en medio fresco<sup>182, 202, 203, 209, 210</sup>, e inactivación enzimática<sup>8, 182, 194</sup>. Otras técnicas utilizadas son la filtración y el lavado de las células<sup>199, 209</sup>.

No obstante, la exposición de los microorganismos a niveles constantes de un antimicrobiano difiere de la situación *in vivo* en la cual los organismos se encuentran normalmente expuestos a niveles fluctuantes de antibiótico. Varios modelos *in vitro*, usando dilución<sup>211-218</sup> o diálisis<sup>219-221</sup>, se han desarrollado para simular la cinética de los

fármacos *in vivo* y proporcionar una reducción más fisiológica de la concentración del antimicrobiano. Sin embargo, con estos modelos puede ser difícil separar los efectos subinhibitorios del antimicrobiano del EPA. No obstante, Bergan y cols.<sup>211</sup> y Gerber y cols.<sup>213</sup>, observaron supresión persistente del crecimiento en estos modelos, incluso después de que las concentraciones cayeran por debajo de la CMI. Sin embargo, ningún investigador ha definido una metodología para cuantificar el EPA en ellos.

El método más empleado y estandarizado para la determinación del EPA es el descrito por Bundtzen<sup>182</sup> en 1981, mediante recuentos del número de unidades formadoras de colonias (UFC) y eliminación del antimicrobiano por centrifugación y lavados repetidos.

Por último, para el estudio de este fenómeno *in vivo* se han descrito varios modelos animales. Los más conocidos son: la infección en el muslo de ratones neutropénicos<sup>177, 222-227</sup>, meningitis en conejos<sup>228, 229</sup> y endocarditis en ratas<sup>230-233</sup>. En cada modelo, la recuperación del crecimiento normal de la población bacteriana se realizó después de que los niveles séricos o tisulares del antimicrobiano descendieran por debajo de la CMI frente al organismo infectante. El crecimiento inmediato de los nuevos organismos inyectados en los animales durante el período putativo del EPA ha confirmado que el efecto *in vivo* no es causado por la persistencia en los tejidos del antimicrobiano activo<sup>181</sup>.

### **3.4.- FACTORES QUE AFECTAN AL EPA**

Existen múltiples factores que pueden afectar a la duración o incluso a la presencia de EPA. Los más importantes y mejor estudiados son el tipo de microorganismo y la clase de antimicrobiano. Relativamente bien estudiadas son la concentración del fármaco y la duración de la exposición al antimicrobiano. El resto de los factores necesitan una investigación más completa.

Los factores relacionados con el antimicrobiano que determinan la presencia y la duración del EPA son: la clase de antimicrobiano y su mecanismo de acción, el tiempo de exposición, la concentración ensayada y la combinación de antibióticos.

Entre los aspectos relativos al microorganismo que pueden modificar la duración del EPA de un antimicrobiano se encuentran: el tipo de microorganismo y, dentro de él, la cepa ensayada, el tiempo de generación de la misma, el tamaño del inóculo, la fase de crecimiento en que se ensaya, la sensibilidad al antibiótico y la asociación bacteriana.

Otros factores que pueden afectar a la presencia de EPA son los relacionados con las condiciones experimentales y dentro de ellas el método de determinación y la eliminación del antibiótico y todos aquellos factores que influyen en la actividad del antimicrobiano como son el pH, la temperatura y la agitación mecánica de los medios de cultivo, los distintos medios de cultivo y la adición a ellos de cationes, orina, suero, albúmina o LCR<sup>5, 234-238</sup>.

### **3.5.- FENÓMENOS RELACIONADOS CON EL EPA**

Se han descrito dos efectos adicionales relacionados con el EPA: 1) "Postantibiotic Leukocyte Enhancement (PALE)" y 2) la disminución de la actividad bactericida de los antimicrobianos durante la fase de EPA.

#### **3.5.1.- "Postantibiotic Leukocyte Enhancement"**

A comienzos de los años 80, McDonald y Pruul<sup>7, 239-241</sup> comprobaron que las bacterias que habían sido expuestas durante un periodo de tiempo breve a la acción de un antimicrobiano eran más sensibles a la capacidad fagocítica de los leucocitos humanos y llamaron a este fenómeno "Postantibiotic Leukocyte Enhancement".

En los años 50 Eagle y cols.<sup>177, 242</sup> demostraron en ratones una disminución en la virulencia de estreptococos si los animales se infectaban por microorganismos que habían sido previamente expuestos a la acción de un antibiótico. Sin embargo, en estos estudios no se determinó si existía algún factor del huésped responsable de este efecto.

En 1981 Gerber y Craig<sup>187</sup> observaron que los microorganismos pretratados cuando se inoculaban en los muslos de ratones normales morían antes que los no tratados. Sin embargo, estos microorganismos no morían cuando se inyectaban en ratones neutropénicos. Estos estudios sugirieron que el PALE era también un fenómeno *in vivo*.

### 3.5.2.- Disminución de la actividad bactericida durante el EPA

Aunque los estudios son limitados, parece ser que durante la fase de EPA los organismos son menos susceptibles a la actividad bactericida de los antimicrobianos.

Gerber y Craig<sup>187</sup> demostraron una disminución en la actividad bactericida de ampicilina sobre *S. pneumoniae* durante la fase de EPA inducida por eritromicina.

Vogelman, Gudmundsson y Craig<sup>243</sup> han observado una resistencia similar en betalactámicos, aminoglucósidos y trimetoprim sobre *S. aureus*, *E. coli* y *K. pneumoniae* durante la fase de EPA inducida por rifampicina. Así, previa exposición a rifampicina se inhibió notablemente la mortalidad de *K. pneumoniae* por cefamandol. Con aminoglucósidos el tiempo requerido para inhibir el crecimiento de *E. coli* y *K. pneumoniae* fue varias horas más largo durante la fase de EPA y estrechamente paralelo a la duración del EPA. Sin embargo, la mortalidad de *S. aureus* por los aminoglucósidos fue sólo ligeramente mayor incluso con EPA mayores de 4 horas.

Así, el grado de inhibición de la actividad bactericida parece ser dependiente de los organismos (mayor para bacilos gram negativos que para cocos gram positivos) y del

antimicrobiano (mayor para trimetoprim y betalactámicos que para aminoglucósidos). Estas observaciones deben tenerse en cuenta a la hora de establecer la dosificación en la terapia antimicrobiana combinada.

#### 4.- FARMACOCINÉTICA OCULAR

Para obtener el éxito en el tratamiento de una infección corneal bacteriana se hace necesario un conocimiento de la farmacocinética ocular buscando la mejor vía de administración a fin de lograr una concentración óptima de antimicrobiano en la córnea<sup>42</sup>.

La capacidad de un fármaco para penetrar en el globo ocular depende de sus características fisicoquímicas y de la vía de administración. La mayoría penetran a través de los fluidos extracelulares, plasma y lágrimas, por difusión simple<sup>58</sup>.

La eficacia de un fármaco instilado en el ojo va a estar relacionada con la farmacocinética del medicamento en el fondo de saco conjuntival, la permeabilidad de la córnea y la velocidad de eliminación del medicamento en el ojo.

En el caso de los colirios, el fármaco llega ya disuelto y no sufre el proceso de liberación, sino que se mezcla con la película lagrimal precorneal y desde aquí se produce la cinética de absorción<sup>57</sup>.

El volumen de lágrimas normal en el fondo de saco conjuntival, sin estimulación, en una persona adulta es de 7-9  $\mu$ l, con una renovación fisiológica de 0'1-0'5  $\mu$ l/minuto. De ello, 1  $\mu$ l es la película corneal. Una gota de colirio contiene un volumen de 30-50  $\mu$ l. Si tenemos en cuenta que la cantidad máxima de líquido que puede contener el fondo de saco conjuntival sin rebosar es alrededor de 30  $\mu$ l, las cantidades excesivas se eliminarán por rebosamiento o a través del conducto nasolagrimal, desde donde pueden absorberse sistémicamente<sup>244</sup>.

Debido a esto, se deduce que instilaciones muy seguidas de muchas gotas no pueden favorecer el aumento de medicamento en el fondo del saco. Tampoco incrementamos la biodisponibilidad ocular cuando mezclamos dos o más fármacos en intervalos de tiempo cortos, puesto que se diluyen mutuamente y disminuye la

biodisponibilidad de cada uno de ellos<sup>57</sup>.

El fármaco, una vez disuelto en la película lagrimal, penetra en el interior del ojo a través de la córnea. Por lo tanto, el estado en el momento de la instilación ocular de la córnea, así como el tipo de medicamento y su presentación farmacéutica, nos variarán la cantidad o concentración del fármaco que haya podido entrar en el ojo<sup>57</sup>.

La desepitelización y el aumento de la vascularización incrementan la penetrabilidad. El peso molecular límite que permite el paso de sustancias por simple difusión a través de los espacios intercelulares según Gimbert y Sinues varia entre 504 y 600, respectivamente<sup>245, 246</sup>. Por otro lado, el gradiente de concentración en la superficie corneal disminuye rápidamente después de la instilación en el fondo de saco conjuntival, por el mecanismo fisiológico del aclaramiento de las lágrimas<sup>247</sup>.

Además, el carácter lipo o hidrofílico de los fármacos instilados en el ojo va a facilitar su mayor o menor absorción<sup>248</sup>. Así el epitelio y el endotelio corneal se comportan como una barrera absolutamente impenetrable para los compuestos hidrosolubles. Mientras que el estroma corneal situado entre las barreras lipofílicas del epitelio y endotelio es permeable a los compuestos hidrosolubles y no a los liposolubles<sup>247</sup>.

De esta forma, agentes liposolubles como cloranfenicol, metronidazol, rifampicina y, posiblemente, trimetropim atraviesan mejor la barrera del epitelio corneal que agentes insolubles en lípidos como penicilinas, cefalosporinas y aminoglucósidos. Por ello, en orden al paso desde la película lagrimal a la córnea, el fármaco ideal para la aplicación tópica debería ser lipo e hidrofílico<sup>249, 250</sup>.

Las inyecciones perioculares atraviesan la barrera epitelial corneal y producen concentraciones muy altas de los fármacos en la esclera<sup>251</sup>, córnea y humor acuoso. Este hecho puede utilizarse en el tratamiento de las infecciones refractarias de la córnea<sup>57</sup>. Estudios en conejos han encontrado concentraciones similares por esta vía esté o no

inflamada la córnea, pero no existen datos comparables en ojos humanos<sup>249</sup>.

Una vez que el medicamento llega a la cámara anterior, los fármacos siguen el recorrido del humor acuoso, es decir, bañan el iris y el cristalino y dejan el ojo a través del canal de Schlemm pasando a la circulación general desde donde se eliminan, al igual que en la administración sistémica, por vía hepática o renal<sup>58</sup>.

Cuando se utiliza el antibiótico por vía sistémica todavía son más las dificultades con que se encuentra el antibiótico, ya que en condiciones sanas del ojo es muy difícil conseguir atravesar las barreras oculares. En condiciones de infección todos los estudios coinciden en afirmar la existencia de mayores niveles de antibiótico en el humor acuoso que se consiguen con la utilización de la vía sistémica<sup>57, 247</sup>.

La excreción de fármacos en las lágrimas no tiene importancia cuantitativa. La eliminación por esta vía depende principalmente de la difusión de las formas no ionizadas liposolubles de los fármacos a través de las células epiteliales de las glándulas y del pH. Probablemente, en los conductos glandulares se produce la reabsorción del fármaco no ionizado presente en la primera secreción y también es posible la secreción activa de los compuestos a través de dichos conductos<sup>252</sup>.

#### **4.1.- VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN LA INFECCIÓN OCULAR CORNEAL**

Para tratar las infecciones oculares se emplean diversas vías de administración. La elección de la vía más adecuada deberá seguir los mismos razonamientos efectuados para la elección del antibiótico, es decir, conseguir la concentración máxima del antibiótico en el lugar de la infección con el mínimo riesgo de toxicidad<sup>57</sup>.

Hay tres vías principales para la administración de los fármacos en el tratamiento de

las infecciones oculares corneales:

- 1) Aplicación tópica, en forma de colirios, pomadas y spray. Es la más habitual. Sirve para tratar infecciones del segmento anterior (conjuntivales, corneales, uveales y esclerales)<sup>253</sup>.
- 2) Inyección periocular, bien subconjuntival o bien retrobulbar.
- 3) Tratamiento sistémico, habitualmente intravenoso o intramuscular, pero ocasionalmente oral<sup>249</sup>.

Otras formas de tratamiento son la iontoforesis y la encapsulación liposomal de los antibióticos.

#### 4.1.1.- Aplicación tópica

Se emplea principalmente por sus efectos locales que permiten la absorción del compuesto a través de la córnea en función de la liposolubilidad del fármaco y del estado del epitelio corneal<sup>247</sup>.

Parece existir una buena correlación entre la concentración de un fármaco en colirio y la concentración alcanzada en la córnea. Por esta razón, es frecuente la práctica del uso de gotas fortificadas, las cuales resultan mucho más concentradas que las presentaciones disponibles comercialmente<sup>249</sup>.

Los fármacos aplicados tópicamente entran en el ojo atravesando la córnea antes que la conjuntiva<sup>254</sup>. Midiendo las concentraciones de los fármacos en el humor acuoso tras la aplicación tópica obtendremos una indicación indirecta de la máxima concentración en la córnea.

La mejor forma para conseguir concentraciones elevadas en la película lagrimal precorneal y, por ende, en la córnea es aplicar frecuentemente gotas altamente concentradas en pequeños volúmenes<sup>255</sup>. Para un efecto máximo, el intervalo entre las gotas no debería ser mayor de 30 minutos<sup>244, 256, 257</sup>. Si se aplica una segunda gota, debe esperarse al menos 5 minutos para evitar el lavado de la primera gota y asegurar que el reflejo lagrimal de la primera gota ha cesado<sup>256</sup>.

La desepitelización de la córnea aumenta la penetración<sup>257</sup>. El pestañeo asegura la continua redistribución del fármaco en la película lagrimal. Los conservantes habitualmente presentes en los colirios pueden aumentar la permeabilidad del epitelio corneal<sup>256</sup>.

Es preferible la utilización de las presentaciones en gotas a los ungüentos en el tratamiento de la úlcera corneal, porque el *petrolatum* de estos puede impedir el paso de un segundo fármaco aplicado después del primero, y porque los ungüentos no pueden ser fortificados fácilmente<sup>249</sup>.

Los ungüentos y las lentillas pueden incrementar el tiempo de contacto de los fármacos en la córnea promoviendo su penetración en la misma. Polímeros solubles como metilcelulosa y polivinilo, aunque incrementan supuestamente el tiempo de contacto, tienen sólo un efecto modesto sobre la absorción corneal<sup>255</sup>. Recientemente ha aumentado el interés por los dispositivos de liberación lenta (injertos oculares) para proveer niveles altos de fármacos en la película precorneal de forma continua<sup>250</sup>. La pérdida por drenaje es reducida y en consecuencia los efectos secundarios son mínimos<sup>252</sup>.

#### 4.1.2.- **Inyección periocular**

Puede administrarse por vía subconjuntival o retrobulbar. Las inyecciones subconjuntivales normalmente se inyectan justo por debajo de la cápsula de Tenon; por ello se llaman, más exactamente, inyecciones subtentonianas anteriores. Sin embargo, la

diferencia entre una verdadera inyección subconjuntival y una inyección subtentoniana anterior en términos de penetración en el humor acuoso es pequeña<sup>107, 258</sup> y muchos autores utilizan el término subconjuntival para designar inyecciones subtentonianas anteriores.

La técnica habitual es introducir la punta de una fina aguja de 2-3 mm detrás del limbo esclerocorneal e inyectar 1'0 ml. Las inyecciones se realizan normalmente en el segmento superior para que el fármaco que escapa bañe la córnea. Si el agujero de punción es grande, cantidades sustanciales de fármaco pueden escapar y entrar en la córnea por las lágrimas y ello es posible si el ojo está inflamado y los tejidos son frágiles. Si se tiene cuidado para minimizar el tamaño del agujero de punción, la mayoría del fármaco permanecerá en el lugar de la inyección, desde el cual difundirá directamente a la córnea y a la esclera<sup>258-260</sup>.

La inyección retrobulbar se hace introduciendo la aguja a través de la conjuntiva (normalmente en el cuadrante temporoinferior) empujándola por detrás del globo en el espacio retrobulbar. Aunque los fármacos inyectados subconjuntivalmente tiendan a permanecer cerca del lugar de inyección por un tiempo, los administrados por vía retrobulbar difunden rápidamente a través de la órbita a la parte posterior del ojo<sup>261</sup>.

Algunos estudios han demostrado que la penetración de los fármacos en el segmento anterior del ojo (córnea, iris y humor acuoso) es mejor mediante la inyección subconjuntival, aunque el acceso al segmento posterior (retina-coroides, humor vítreo) se vea favorecido por la inyección retrobulbar<sup>261</sup>. Así, se ha encontrado que la inyección subconjuntival es realmente superior a la administración retrobulbar en alcanzar niveles altos de antibióticos en la córnea y humor acuoso de conejos y titis. La penetración de los fármacos en el humor vítreo normal, fue mayor con la inyección subconjuntival en conejos<sup>61</sup>, pero con la inyección retrobulbar en monos<sup>262</sup>. Sin embargo, las vías fueron equivalentes en la penetración en el humor vítreo si los ojos estaban inflamados.

Por ello, generalmente preferimos la vía subconjuntival a la retrobulbar, ya que la penetración en la córnea es mayor y es equivalente a la inyección retrobulbar en la penetración en el humor vítreo inflamado<sup>250</sup>.

Las inyecciones perioculares muestran variaciones importantes en la concentración en los tejidos dependiendo de la distancia al lugar de inyección. Además, se han encontrado discrepancias en los resultados dependiendo de los animales con los que se ensaye, probablemente debidos a las diferencias existentes en el tamaño, forma y vascularización sanguínea de las estructuras oculares<sup>61, 262</sup>. Estas consideraciones complican la interpretación de la farmacocinética de los medicamentos administrados por inyección periorcular. No obstante, esta vía de administración produce altas concentraciones de fármacos excedentes en la córnea y humor acuoso, lo cual puede ser beneficioso para la clínica. Desafortunadamente, debido al efecto de barrera del epitelio retinal pigmentado, muchos antibióticos aplicados en inyección periorcular penetran en el humor vítreo pobremente<sup>107, 263</sup>.

#### 4.1.3.- Tratamiento sistémico

Por esta vía los fármacos se encuentran con las barreras hemato-oculares, y su nivel de penetración es mayor en aquellos que circulan libremente (penicilinas y cefalosporinas) que en los que se unen a proteínas (aminoglucósidos y tetraciclinas)<sup>58</sup>.

La penetración en la córnea y en el humor acuoso después de la administración sistémica de agentes antimicrobianos es pobre, siendo probablemente menores que las alcanzadas mediante la administración tópica y mucho más bajas que las producidas por la inyección subconjuntival<sup>249</sup>.

Muchos estudios del ojo humano han encontrado concentraciones de los fármacos en el humor acuoso mayores que en la córnea. Parece existir una buena correlación entre

los dos sitios para penicilinas y aminoglucósidos después de la administración sistémica en conejos<sup>107</sup>. Sin embargo, en un estudio en humanos, las concentraciones en humor acuoso de gentamicina fueron menores, una décima parte de los valores más altos encontrados en la córnea<sup>24</sup>.

Así pues, las concentraciones alcanzadas en el humor acuoso pueden darnos una estimación del mínimo nivel presente en la córnea después de la administración sistémica<sup>264</sup>.

#### 4.1.4.- **Iontoforesis**

Es una técnica mediante la cual conseguimos aumentar la penetración intraocular de los fármacos, que poseen una naturaleza polar, por la aplicación de una corriente eléctrica a través del ojo<sup>265-269</sup>. Ha sido muy utilizada en la administración tópica de los fármacos y, también, en la facilitación de la penetración vítrea de estreptomina tras la inyección retrobulbar<sup>267</sup>.

#### 4.1.5.- **Encapsulación liposomal de los antibióticos**

Los liposomas pueden utilizarse para disminuir la toxicidad sistémica de fármacos como anfotericina B, incrementando de ese modo la proporción terapéutica<sup>270-272</sup>. Las vesículas lipídicas actúan primeramente como depósito de los fármacos que contienen, y que liberan lentamente a los tejidos de alrededor, lo cual puede influir favorablemente en la farmacocinética de los antibióticos, aumentando su penetración en los tejidos oculares.

Administrados tópicamente, los liposomas pueden absorberse por la superficie corneal y facilitar la transferencia de los fármacos al epitelio corneal<sup>273</sup>. Sin embargo, en ocasiones se ha visto que la encapsulación liposomal de determinados fármacos puede disminuir su absorción<sup>274</sup>.

Con la inyección periocular de los antibióticos se han encontrado concentraciones sustanciales de antibiótico en la córnea por largos períodos de tiempo, al ser éstos encapsulados por los liposomas<sup>275</sup>. Por vía endovenosa se toleran bien, siendo absorbidos ávidamente por el sistema reticuloendotelial<sup>276</sup>.

## **II.- OBJETIVOS**

- 1° Estudio de la actividad antimicrobiana medida en CMI y CMB de *S. pneumoniae* ATCC 6303, *S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 12228, *E. coli* ATCC 25922, *P. vulgaris* ATCC 13315 y *P. aeruginosa* ATCC 9721 frente a ofloxacino, tiamfenicol, rifampicina, gentamicina y tobramicina.
  
- 2° Estudio del efecto postantibiótico de estos antimicrobianos frente a las 6 cepas que se ensayan después de su exposición durante un hora a diferentes concentraciones de los mismos (normalmente a CMI y 10 CMI).
  
- 3° Valoración de la eficacia de ofloxacino en el tratamiento y profilaxis de la úlcera corneal en un modelo experimental en conejos por *S. pneumoniae* ATCC 6303 y *P. vulgaris* ATCC 13315.
  
- 4° Valoración de la eficacia de tiamfenicol y tobramicina frente a placebo en el tratamiento y profilaxis de la úlcera corneal en un modelo experimental en conejos por *S. pneumoniae* ATCC 6303.

### **III.- MATERIAL Y MÉTODOS**

## 1.- ESTUDIOS IN VITRO

### 1.1.- CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EXPRESADA EN FUNCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS Y BACTERICIDAS

#### 1.1.1.- Microorganismos

*S. pneumoniae* ATCC 6303.

*P. vulgaris* ATCC 13315.

*S. aureus* ATCC 29213.

*E. coli* ATCC 25922.

*S. epidermidis* ATCC 12228.

*P. aeruginosa* ATCC 9721.

Las cepas se conservaron en placas de agar a 0°C, realizándose resiembras en medio fresco cada 4-5 días. El día previo al experimento se inocularon en caldo o agar según el trabajo, e incubaron a 37°C durante 16-20 horas.

#### 1.1.2.- Antibióticos

Los antimicrobianos utilizados fueron: ofloxacino (DL-8280), tiamfenicol (Zambón), rifampicina (Marion Merrell Dow), gentamicina (Schering-Plough) y tobramicina (Alcón-Iberhis) suministrados en forma de polvo valorado por los distintos laboratorios farmacéuticos.

Los "stocks" se prepararon conforme a las instrucciones de cada laboratorio y se guardaron en alícuotas (Eppendorf) de 1 ml cada una, conservándose a -18°C hasta su utilización. Para cada ensayo se diluyeron en un medio apropiado hasta conseguir la concentración deseada.

### 1.1.3.- **Medios**

Se ha usado caldo de Müller-Hinton (MHB; Oxoid) para *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas*. El manejo de *S. pneumoniae* se realizó suplementando dicho medio con sangre desfibrinada de carnero al 5% (Oxoid).

Los recuentos de UFC se hicieron sobre agar de Müller-Hinton (MH; Oxoid) para *Staphylococcus*, *Pseudomonas* y *E. coli*. Sobre agar de Müller-Hinton suplementado al 5% con sangre desfibrinada de carnero para *S. pneumoniae*, y sobre agar de Cled (bioMérieux) para *Proteus vulgaris*.

El pH se ajustó en todos los casos a  $7.2 \pm 0.2$ .

La solución salina se preparó diluyendo 9 g de cloruro sódico (ClNa; Panreac) en un litro de agua destilada estéril.

### 1.1.4.- **Concentración mínima inhibitoria**

La CMI se determinó por el método de macrodilución en caldo (tubo)<sup>277</sup>.

Se realiza en caldo a temperatura ambiente. Para cada determinación utilizamos una batería de 13 tubos de ensayo de vidrio de  $10.3 \pm 0.2$  mm de diámetro, estériles, que se cierran con tapones de algodón graso y se colocan en orden a la concentración de antimicrobiano que contendrán, de mayor a menor concentración.

El primer tubo corresponde a la mayor concentración de antimicrobiano que se ensaya y que preparamos a una concentración doble de antibiótico en un volumen de caldo de 2 ml, el resto de los tubos contiene 1 ml de caldo sin antimicrobiano.

Desde este primer tubo y usando siempre la misma micropipeta (Gibson) y previa agitación del tubo en un vórtex (Heidolph Reux 2000) separamos 1 ml que llevamos al tubo siguiente de la batería de tubos y así sucesivamente. Al final dejamos un tubo control sin antimicrobiano.

A cada uno de estos tubos añadimos 1 ml de inóculo, que hemos preparado ajustando la turbidez de un tubo con solución salina y microorganismos en fase logarítmica de crecimiento al tubo 1 de la escala de McFarland ( $3 \cdot 10^8$  UFC/ml). Desde aquí diluimos en caldo hasta conseguir una concentración final de inóculo de  $10^5$  UFC/ml.

De esto resulta una dilución 1:2 de cada concentración de antimicrobiano y en una dilución 1:2 del inóculo. Los tubos se agitan bien en un vórtex y se llevan a la estufa (Heraeus) a 37°C durante 16-20 horas.

La CMI se lee como la menor concentración de agente antimicrobiano -medida en  $\mu\text{g/ml}$ - que inhibe completamente el crecimiento del organismo (turbidez) detectado sin otra ayuda que la simple observación ocular. Cada ensayo se repite tres veces y se toma como valor final el resultante de la aplicación de la media aritmética.

#### 1.1.5.- **Concentración mínima bactericida**

Se calcula resemebrando sobre placas de agar y con un asa de platino unos 10  $\mu\text{l}$  del contenido de cada tubo -previa agitación en el vórtex- por encima del que hemos leído como CMI. Las placas se incuban a 37°C durante 16-20 horas.

La CMB se registra como la menor concentración de agente antimicrobiano -medida en  $\mu\text{g/ml}$ - que inhibe completamente el crecimiento sobre la superficie de agar, y se corresponde con un porcentaje de mortalidad bacteriana del 99%.

## **1.2.- CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EXPRESADA EN FUNCIÓN DEL EFECTO POSTANTIBIÓTICO**

Se utilizan los mismos microorganismos, antibióticos y medios del estudio precedente.

### **1.2.1.- Preparación del inóculo**

Todos los experimentos se realizaron con cultivos de microorganismos que estaban en fase logarítmica de crecimiento al tiempo de la exposición a los antibióticos. Para ello, a partir de un inóculo puro en agar y con un asa se sembraron 4-5 colonias en un caldo apropiado, que se incubó en la estufa a 37°C durante la noche anterior a cada experimento. *S. pneumoniae* se incubó en atmósfera de CO<sub>2</sub>. Desde aquí, y a la mañana siguiente, se diluyó el cultivo en medio fresco hasta alcanzar una concentración final de 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> UFC/ml.

### **1.2.2.- Cinética de crecimiento bacteriano**

Preparado el inóculo se reparte en matraces de vidrio de 250 ml graduados y estériles que se cierran con tapones de algodón graso. En cada matraz depositamos 50 ml de caldo con el inóculo bacteriano y añadimos las concentraciones deseadas de los antimicrobianos a estudiar (normalmente se ensaya a CMI y 10 CMI). Este punto se definió como tiempo cero de la exposición del microorganismo al antimicrobiano. Además dejamos un matraz conteniendo 50 ml del caldo con el inóculo, pero sin antibiótico.

A continuación todos los matraces se incuban en un baño María (Selecta Unitronic Mod 320 OR) a 37°C y con agitación a 55 rpm durante 1 hora.

### 1.2.3.- **Eliminación del antibiótico**

Tras una hora de exposición de los cultivos a las distintas concentraciones de antibiótico, éste se eliminó por dilución 1/1.000 en medio fresco<sup>181</sup>. Para ello se tomaron 50 µl de cada matraz y se añadieron a nuevos matraces que contenían 50 ml de caldo a temperatura ambiente, con lo que el efecto del antimicrobiano quedó anulado. También procedemos a la dilución -de igual forma- del matraz que no contiene antibiótico.

A continuación todos los matraces se llevaron a incubación en un baño María a 37°C y con agitación a 55 rpm durante 6-8 horas seguidas.

### 1.2.4.- **Recuentos bacterianos**

La técnica empleada, descrita por varios autores<sup>180, 277</sup>, se realizó mediante dilución decimal de los cultivos en CINA al 0'9% en agua destilada estéril y a temperatura ambiente. Una muestra de 25 µl de cada dilución se plaqueó con un asa de Dubrasky sobre la superficie de agar de una placa de Petri de 9 cm de diámetro.

Las placas se leyeron tras incubación de 18-24 horas en estufa a 37°C, calculándose entonces la concentración del cultivo. No se tuvieron en cuenta las placas con un número de colonias por debajo de 20 ó por encima de 200. En el caso del *S. pneumoniae* la lectura se realizó a las 24-48 horas de incubación a 37°C, en estufa de CO<sub>2</sub>.

El recuento de UFC se hizo para todos los cultivos en el tiempo cero de la exposición al antibiótico, antes y después de la dilución del mismo y cada hora durante 6-8 horas seguidas. Y se toma como valor final el obtenido por la aplicación de la media aritmética de tres experimentos ± el error estándar (ES) para cada concentración de antibiótico.

### 1.2.5.- Cuantificación del EPA

Se realizó el siguiente cálculo utilizado por Bundtzen y cols.<sup>8, 182</sup> para la cuantificación del EPA de los antibióticos, por comparación con experimentos similares desarrollados en diferentes días:

$$\text{EPA} = \text{T} - \text{C}$$

**T** = tiempo en horas requerido para que el recuento de UFC en los cultivos se incremente un logaritmo de base diez sobre el recuento inmediatamente realizado después de la dilución.

**C** = tiempo en horas requerido para que el recuento de UFC en los cultivos de control se incremente un logaritmo de base diez sobre el recuento inmediatamente realizado después de la dilución.

**T - C** = intervalo de tiempo en horas durante el cual el antibiótico parece afectar al crecimiento bacteriano después de la exposición.

Este valor se ha usado como comparación básica de los efectos de inhibición persistente del crecimiento bacteriano tras la exposición de los organismos a todos los antibióticos estudiados.

Los resultados obtenidos con esta fórmula se consideraron significativos cuando el EPA fue mayor o igual a 30 minutos<sup>8, 182</sup>, estableciéndose una escala de valores en función del tiempo obtenido, y así hablamos de EPA corto entre 30 y 90 minutos; intermedio entre 1'5 y 3 horas; y largo si es mayor de 3 horas<sup>181, 278</sup>.

Las Curvas de EPA se elaboraron a partir de los recuentos bacterianos efectuados cada hora -desde el tiempo cero- y durante 6-8 horas seguidas.

## 2.- **ESTUDIOS IN VIVO**

### 2.1.- **MODELO EXPERIMENTAL DE QUERATITIS BACTERIANA EN CONEJOS POR *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* Y *PROTEUS VULGARIS*. TRATAMIENTO CON OFLOXACINO**

#### 2.1.1.- **Animales de experimentación**

Se han utilizado 30 ojos correspondientes a 30 conejos albinos de la raza New Zealand (suministrados por Conejos "Las Brañas" S.A.) cuyo peso osciló entre 1'750 y 2'250 Kg, de 6-8 semanas de edad y machos. Los animales se mantuvieron con aporte de agua y pienso *ad libitum* vigilando que no presentaran patología alguna.

#### 2.1.2.- **Microorganismos**

*S. pneumoniae* ATCC 6303.

*P. vulgaris* ATCC 13315.

#### 2.1.3.- **Soluciones oftálmicas**

Ofloxacino, Código DL-8280, Lote 305.

Para preparar la solución oftálmica se pesaron 0'3 g de polvo valorado de OFX y se diluyeron en 100 ml de solución salina estéril al 0'9%, ajustando el pH con ClH 1N entre 5'8 y 6'5.

#### 2.1.4.- **Anestésicos**

Oxibuprocaina al 0'4%.

#### 2.1.5.- **Preparación del inóculo**

De un cultivo en placa del día anterior, se prepara un inóculo en solución salina estéril, a una concentración final de  $3 \cdot 10^8$  UFC/ml y de  $1'5 \cdot 10^8$  UFC/ml para *S. pneumoniae* y *P. vulgaris*, respectivamente.

#### 2.1.6.- **Inoculación**

Previa instilación de anestésico tópico, se realiza desepitelización corneal e inyección intraestromal de 0'05 ml de inóculo con aguja 28 G en la córnea izquierda de cada uno de los conejos según la técnica descrita por Zato<sup>279</sup>. Trabajamos con 6 grupos de animales:

Los grupos del 1 al 3 corresponden a ojos inoculados con *S. pneumoniae*. Al primer grupo se le asignan 3 conejos y a los otros dos 6.

Los grupos del 4 al 6 corresponden a ojos inoculados con *P. vulgaris*. Al primer grupo se le asignan 3 conejos y a los otros dos 6.

**Grupos 1 y 4:** no reciben tratamiento.

**Grupos 2 y 5:** el OI se trata con ofloxacino desde 1 hora antes de la inoculación, siguiendo después con una pauta de 2 gotas cada 8 horas durante 15 días seguidos.

**Grupos 3 y 6:** el OI se trata con ofloxacino a partir de las 24 horas de la inoculación y con una pauta de 2 gotas cada 8 horas durante 15 días seguidos.

#### 2.1.7.- **Valoración clínica**

Previo a la toma de muestra para el cultivo, se realiza una evaluación clínica a los 3, 7 y 15 días de la inoculación, valorando las alteraciones a nivel de córnea, úvea anterior y conjuntiva de cada conejo. Cada parámetro estudiado se cuantifica de 0 a 3 según la menor o mayor afectación, como puede verse en las Tablas 1a, 1b, 1c y 1d.

#### 2.1.8.- **Estudio microbiológico**

Se hacen determinaciones del exudado conjuntival y corneal a los 3, 7 y 15 días de la inoculación, mediante raspado con asa de platino del fondo de saco conjuntival y de la córnea, respectivamente. Inmediatamente se realiza siembra directa de las muestras en agar sangre para *S. pneumoniae* y en agar de MH para *P. vulgaris* y se lleva a incubación en una estufa a 37°C. La lectura se hace a las 24 y 48 horas, y se interpreta como resultado positivo la aparición de crecimiento y como resultado negativo la ausencia de crecimiento.

#### 2.1.9.- **Análisis estadístico de los resultados**

Al final del estudio, se analizaron estadísticamente los resultados clínicos y microbiológicos de cada grupo, con el objetivo de establecer las diferencias existentes entre ellos. El método utilizado fue el de la *t* de Student.

<b>C Ó R N E A</b>	Edema	No existe Leve Moderado, permite ver cámara anterior Intenso, no permite ver cámara anterior No valorable	0 1 2 3 -
	Leucoma	No existe < 2 mm 2 - 4 mm > 4 mm No valorable	0 1 2 3 -
	Neovascularización	No existe < 1 cuadrante 1 - 2 cuadrantes > 2 cuadrantes No valorable	0 1 2 3 -
	Úlcera	No existe < 2 mm 2 - 4 mm > 4 mm No valorable	0 1 2 3 -
	Deformación morfológica	No existe Leve Moderada Intensa No valorable	0 1 2 3 -

Tabla 1a: Valoración semiográfica de la córnea.

<b>C Á M A R A A N T E R I O R</b>	Tindall	No existe Leve Moderado Intenso No valorable	0 1 2 3 -
	Hipopión	No existe < 2 mm 2 - 4 mm > 4 mm No valorable	0 1 2 3 -
	Hifema	No existe < 2 mm 2 - 4 mm > 4 mm No valorable	0 1 2 3 -
	Formación de fibrina	No existe Leve Moderada Intensa No valorable	0 1 2 3 -

Tabla 1b: Valoración semiográfica de la cámara anterior.

<b>I R I S</b>	Hiperemia	No existe	0
		Leve	1
		Moderada	2
		Intensa	3
		No valorable	-
	Irregularidad pupilar	No existe	0
		Leve	1
		Moderada	2
		Intensa	3
Sinequias	No existe	0	
	Leve	1	
	Moderada	2	
	Intensa	3	
	No valorable	-	

Tabla 1c: Valoración semiográfica del iris.

<b>C O N J U N T I V A</b>	Hiperemia conjuntival	No existe	0
		Leve	1
		Moderada	2
		Intensa	3
		No valorable	-
	Hiperemia ciliar	No existe	0
		Leve	1
		Moderada	2
		Intensa	3
		No valorable	-
	Quemosis	No existe	0
		Leve	1
		Moderada	2
		Intensa	3
		No valorable	-
	Secreción	No existe	0
Leve, solo en fondo de saco		1	
Moderada, en fondo de saco y canto interno		2	
Intensa, ojo pegado		3	
No valorable		-	

Tabla 1d: Valoración semiográfica de la conjuntiva.

## 2.2.- MODELO EXPERIMENTAL DE QUERATITIS BACTERIANA EN CONEJOS POR *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*. TRATAMIENTO CON TIAMFENICOL Y TOBRAMICINA

### 2.2.1.- Animales de experimentación

Se han utilizado 36 ojos correspondientes a 36 conejos albinos de la raza New Zealand (suministrados por Conejos "Las Brañas" S.A.) cuyo peso osciló entre 1'750 y 2'250 Kg, de 6-8 semanas de edad y machos. Los animales se mantuvieron con aporte de agua y pienso *ad libitum* vigilando que no presentaran patología alguna.

### 2.2.2.- Microorganismos

*S. pneumoniae* ATCC 6303.

### 2.2.3.- Soluciones oftálmicas

Placebo (Excipiente sin sustancia activa, Zambón).

Tiamfenicol colirio 0'5% (Zambón).

Tobrex Solución Oftálmica (Alcón-Iberhis).

### 2.2.4.- Anestésicos

Tiopental sódico.

Oxibuprocaina al 0'4%.

### 2.2.5.- **Preparación del inóculo**

De un cultivo en placa del día anterior, se prepara un inóculo en solución salina estéril a una concentración final de  $5 \cdot 10^8$  UFC/ml.

### 2.2.6.- **Inoculación**

Previa anestesia general con tiopental 15 mg/Kg/IV e instilación de anestésico tópico, se realiza desepitelización corneal e inyección intraestromal de 0'05 ml de inóculo con aguja 28 G, en la córnea izquierda de cada uno de los conejos. Trabajamos con 6 grupos de 6 animales:

**Grupo 1:** el OI se trata con placebo desde 1 hora antes de la inoculación, siguiendo después con una pauta de 2 gotas cada 8 horas durante 15 días seguidos.

**Grupo 2:** el OI se trata con placebo a partir de las 24 horas de la inoculación y con una pauta de 2 gotas cada 8 horas durante 15 días seguidos.

**Grupo 3:** el OI se trata con tiamfenicol desde 1 hora antes de la inoculación, siguiendo después con una pauta de 2 gotas cada 8 horas durante 15 días seguidos.

**Grupo 4:** el OI se trata con tiamfenicol a partir de las 24 horas de la inoculación y con una pauta de 2 gotas cada 8 horas durante 15 días seguidos.

**Grupo 5:** el OI se trata con tobramicina desde 1 hora antes de la inoculación, siguiendo después con una pauta de 2 gotas cada 8 horas durante 15 días seguidos.

**Grupo 6:** el OI se trata con tobramicina a partir de las 24 horas de la inoculación y con una pauta de 2 gotas cada 8 horas durante 15 días seguidos.

A cada uno de los 6 grupos y a cada fármaco se le adjudica un código de colores de tal forma que cada fármaco se administra a un grupo de profilaxis y a otro de tratamiento y en todo momento se desconoce el tipo de fármaco que se está instilando.

### **2.2.7.- Valoración clínica**

Previo a la toma de muestra para el cultivo, se realiza una evaluación clínica a los 3, 7 y 15 días de la inoculación, valorando las alteraciones a nivel de córnea, úvea anterior y conjuntiva de cada conejo. Cada parámetro estudiado se cuantifica de 0 a 3 según la menor o mayor afectación, como puede verse en las Tablas 1a, 1b, 1c y 1d.

### **2.2.8.- Estudio microbiológico**

Se hacen determinaciones del exudado conjuntival y corneal a los 3, 7 y 15 días de la inoculación, mediante raspado con asa de platino del fondo de saco conjuntival y de la córnea, respectivamente. Inmediatamente se realiza siembra directa de las muestras en agar sangre y se lleva a incubación en una estufa a 37°C. La lectura se hace a las 24 y 48 horas y se interpreta como resultado positivo la aparición de crecimiento y como resultado negativo la ausencia de crecimiento.

### **2.2.9.- Evaluación del número de bacterias viables presentes en la córnea extraída**

Previo administración de una dosis IV letal de tiopental, se realiza una queratectomía con tijeras de todas las córneas, que se introducen inmediatamente en

solución salina estéril y se someten a un proceso de agitación durante 5 minutos seguidos en un vórtex. A continuación se realizan diluciones seriadas del líquido de fase, que se siembran mediante extensión de un volumen 25  $\mu$ l con un asa de Dubrasky en agar sangre, para su recuento tras incubación a 37°C. La lectura se hace a las 24 y 48 horas, y se cuantifica atendiendo al número de UFC/ml encontradas.

#### **2.2.10.- Estudio anatomopatológico**

Se realiza evaluación histopatológica de un ojo del grupo placebo, elegido al azar, al final del tiempo de experimentación.

#### **2.2.11.- Análisis estadístico de los resultados**

Al final del estudio, se analizaron estadísticamente los resultados clínicos y microbiológicos de cada grupo, con objeto de establecer las diferencias existentes entre ellos. El método utilizado fue el de la *t* de Student.

#### **IV.- RESULTADOS**

---

## 1.- RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS IN VITRO

### 1.1.- CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EXPRESADA EN FUNCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS Y BACTERICIDAS

#### 1.1.1.- Concentración mínima inhibitoria

Ofloxacino, al igual que gentamicina, presentó una CMI en el límite de la resistencia frente al *S. pneumoniae*. Frente a los *Staphylococcus* mostró una sensibilidad igual a la de los aminoglucósidos.

Frente a *E. coli* presentó la mayor sensibilidad, 16 veces más sensible que los aminoglucósidos. También frente a *P. vulgaris*, presentó la mayor sensibilidad, pero fue sólo dos veces más sensible que gentamicina y tobramicina. Frente a *P. aeruginosa* se mostró sensible, con una CMI menor que gentamicina y mayor que tobramicina.

Tiamfenicol fue sensible para el *S. pneumoniae* con una CMI menor que la de ofloxacino y los aminoglucósidos. También presentó buena sensibilidad frente al *S. epidermidis*, pero frente al *S. aureus* -al igual que frente al *P. vulgaris*- mostró una CMI de sensibilidad intermedia (CMI = 32 µg/ml). En cualquier caso, *E. coli* y *P. aeruginosa* fueron resistentes al tiamfenicol.

Destaca la gran sensibilidad presentada por rifampicina frente a todos los organismos gram positivos. Sin embargo, era de esperar su pobre actividad frente a los gram negativos, cuya CMI superó en todos los casos el límite de la resistencia establecido en 4 µg/ml.

Los aminoglucósidos presentaron unas CMI sensibles y superponibles para los *Staphylococcus* y las *Enterobacteriaceae*. *S. pneumoniae* se mostró resistente a

tobramicina, pero *P. aeruginosa* fue la que presentó mejor sensibilidad a tobramicina (CMI = 0'25 µg/ml).

### 1.1.2.- **Concentración mínima bactericida**

En general encontramos coincidencia entre los valores de CMI y CMB, lo cual no es de extrañar ya que se trata de antibióticos por definición bactericidas. Sólo en el caso de *Proteus vulgaris* frente a rifampicina y tiamfenicol -bacteriostático- vemos que la CMB supera con creces la CMI.

En la Tabla 2 se detallan los valores de la CMI y CMB.

ANTIMICROBIANO	MICROORGANISMO	CMi µg/ml	CMB µg/ml
Ofloxacino	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 6303	4	4
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0'5	0'5
	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0'5	0'5
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0'03	0'03
	<i>P. vulgaris</i> ATCC 13315	0'06	0'06
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9721	0'5	1
Tiamfenicol	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 6303	2	2
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	32	32
	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	4	8
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	64	128
	<i>P. vulgaris</i> ATCC 13315	32	>128
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9721	64	128
Rifampicina	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 6303	0'03	0'03
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0'015	0'03
	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0'015	0'03
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	8	8
	<i>P. vulgaris</i> ATCC 13315	16	128
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9721	32	32
Gentamicina	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 6303	4	4
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0'25	0'25
	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0'12	0'12
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0'5	0'5
	<i>P. vulgaris</i> ATCC 13315	0'12	0'25
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9721	1	2
Tobramicina	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 6303	8	16
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0'25	0'25
	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0'25	0'25
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0'5	0'5
	<i>P. vulgaris</i> ATCC 13315	0'12	0'25
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9721	0'25	0'5

Tabla 2: Concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas de ofloxacino, tiamfenicol, rifampicina, gentamicina y tobramicina frente a cepas estándar de *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. vulgaris* y *P. aeruginosa*.

## 1.2.- CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EXPRESADA EN FUNCIÓN DEL EFECTO POSTANTIBIÓTICO

### 1.2.1.- Efecto sobre el crecimiento de *S. pneumoniae* ATCC 6303 tras la exposición durante una hora a varios antimicrobianos

**Ofloxacino:** con un inóculo de  $10^6$  UFC/ml, no encontramos EPA a CMI. Con concentraciones de  $6,8 \mu\text{g/ml}$  se obtuvo un EPA de 1'1 horas, que se prolongó a 3'1 horas a 10 CMI, observando que los cultivos empezaban a recuperarse entre la 6<sup>a</sup> y la 7<sup>a</sup> hora de seguimiento, en este último caso.

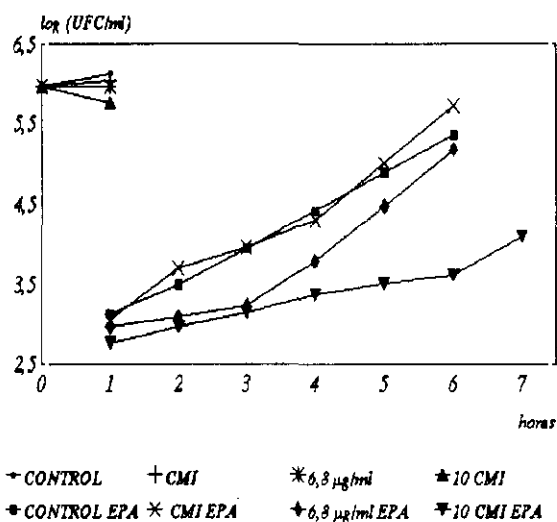


Fig. 5: EPA de ofloxacino a CMI,  $6,8 \mu\text{g/ml}$  y 10 CMI frente a *S. pneumoniae* ATCC 6303.

**Tiamfenicol:** con un inóculo de  $10^7$  UFC/ml, presentó un EPA de 0'9 horas a CMI, que se prolongó a 2 horas a 10 CMI, observando que los cultivos empezaban a recuperarse a partir de la 5<sup>a</sup> hora de seguimiento, en este último caso.

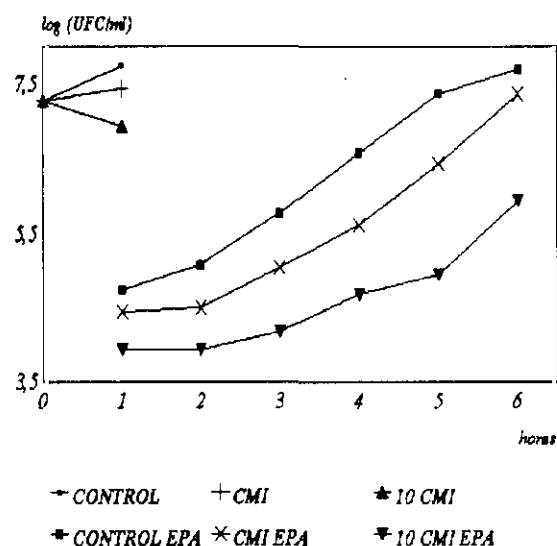


Fig. 6: EPA de tiamfenicol a CMI y 10 CMI frente a *S. pneumoniae* ATCC 6303.

**Rifampicina:** con un inóculo de  $10^7$  UFC/ml, mostró un EPA poco significativo, de 0'5 horas, a CMI. A 10 CMI el EPA fue de 1'9 horas, observándose una recuperación de los cultivos a partir de la 5ª hora de seguimiento.

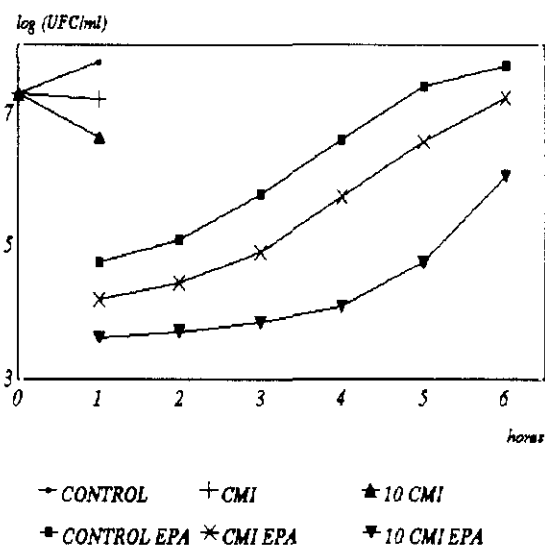


Fig.7: EPA de rifampicina a CMI y 10 CMI frente a *S. pneumoniae* ATCC 6303.

**Gentamicina:** con un inóculo de  $10^7$  UFC/ml, mostró un EPA poco significativo, de 0'6 horas, a CMI. A 10 CMI no encontramos recuperación de los cultivos después de 7 horas de seguimiento, pudiendo decir que el EPA será mayor de 5 horas.

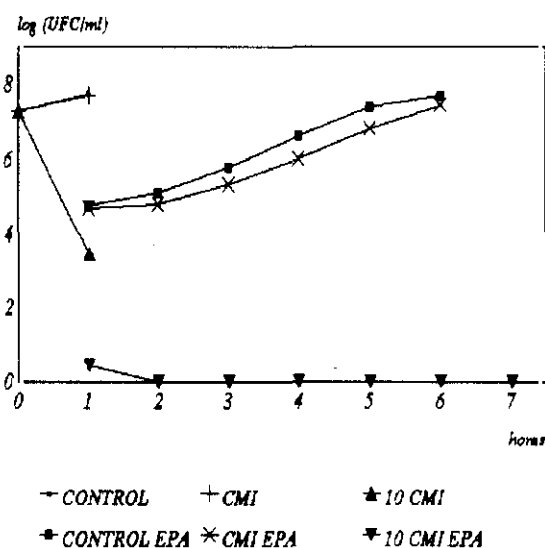


Fig.8: EPA de gentamicina a CMI y 10 CMI frente a *S. pneumoniae* ATCC 6303.

**Tobramicina:** con un inóculo de  $10^6$  UFC/ml, el EPA a CMI fue de 0'8 horas. A 10 CMI fue imposible cuantificar el EPA dada la marcada actividad bactericida del antibiótico que nos dejó sin inóculo bacteriano tras la dilución.

Con un inóculo de  $10^7$  UFC/ml, presentó un EPA de 0'9 horas a CMI, que se prolongó a 3'4 horas a 10 CMI, observando que los cultivos empezaban a recuperarse entre la 6ª y la 7ª hora de seguimiento, en este último caso.

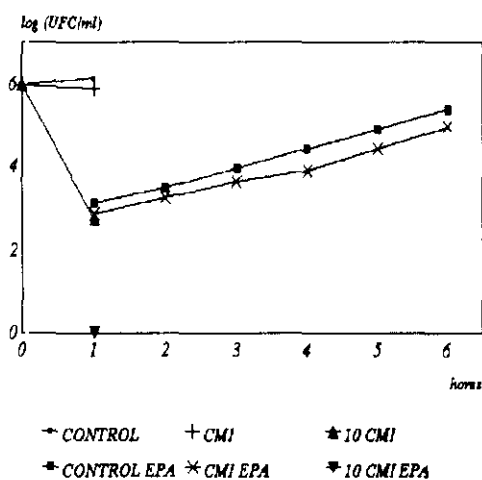


Fig.9: EPA de tobramicina a CMI y 10 CMI frente a *S. pneumoniae* ATCC 6303.

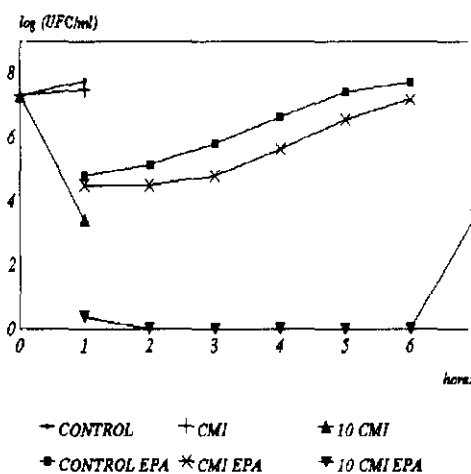


Fig.10: EPA de tobramicina a CMI y 10 CMI frente a *S. pneumoniae* ATCC 6303.

### 1.2.2.- Efecto sobre el crecimiento de *S. aureus* ATCC 29213 tras la exposición durante una hora a varios antimicrobianos

**Ofloxacino:** con un inóculo de  $10^7$  UFC/ml, no encontramos EPA a  $\frac{1}{2}$  CMI, a CMI mostró un EPA poco significativo de 0'5 horas, que se prolongó a 1'3 horas a 5 CMI. A 10 CMI el EPA fue de 1'9 horas, observándose una recuperación de los cultivos entre la 4ª y la 5ª hora de seguimiento.

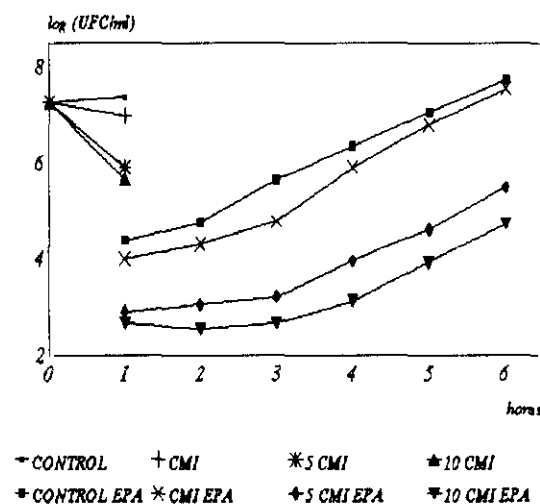


Fig. 11: EPA de ofloxacino a CMI, 5 CMI y 10 CMI frente a *S. aureus* ATCC 29213.

**Tiamfenicol:** con un inóculo de  $10^7$  UFC/ml, presentó un EPA de 1'1 horas a CMI, que se prolongó a 2'9 horas a 10 CMI, observando que los cultivos empezaban a recuperarse entre la 5ª y la 6ª hora de seguimiento, en este último caso.

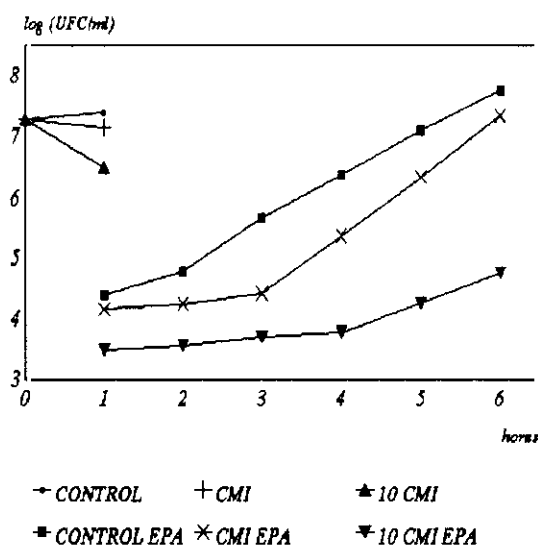


Fig. 12: EPA de tiamfenicol a CMI y 10 CMI frente a S. aureus ATCC 29213.

**Rifampicina:** con un inóculo de  $10^7$  UFC/ml, presentó un EPA de 0'9 horas a CMI. A 10 CMI no encontramos recuperación de los cultivos después de 6 horas de seguimiento, pudiendo decir que el EPA será mayor de 3'3 horas.

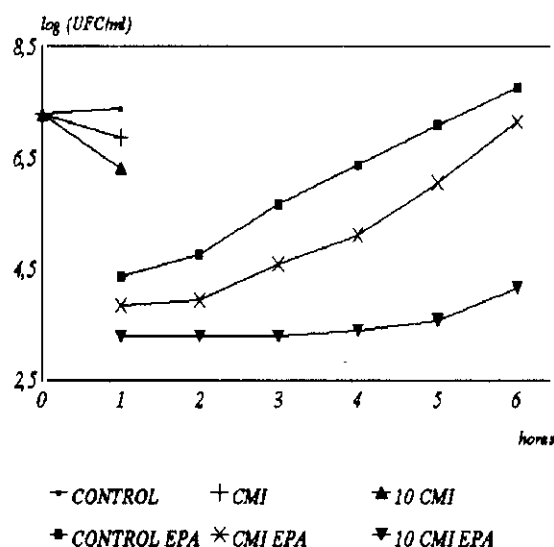


Fig. 13: EPA de rifampicina a CMI y 10 CMI frente a S. aureus ATCC 29213.

**Gentamicina:** con un inóculo de  $10^7$  UFC/ml, mostró un EPA poco significativo, de 0'5 horas, a CMI, que se prolongó a 2'1 horas a 10 CMI, observando que los cultivos empezaban a recuperarse entre la 4ª y la 5ª hora de seguimiento, en este último caso.

**Tobramicina:** con un inóculo de  $10^7$  UFC/ml, presentó un EPA de 1'9 horas a CMI, que se prolongó a 2'2 horas a 10 CMI, observando que los cultivos empezaban a recuperarse a partir de la 5ª hora de seguimiento, en este último caso.

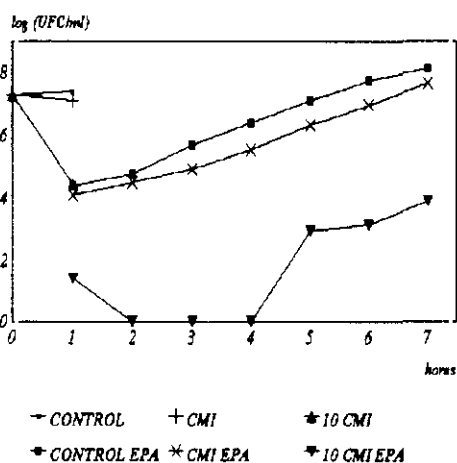


Fig. 14: EPA de gentamicina a CMI y 10 CMI frente a *S. aureus* ATCC 29213.

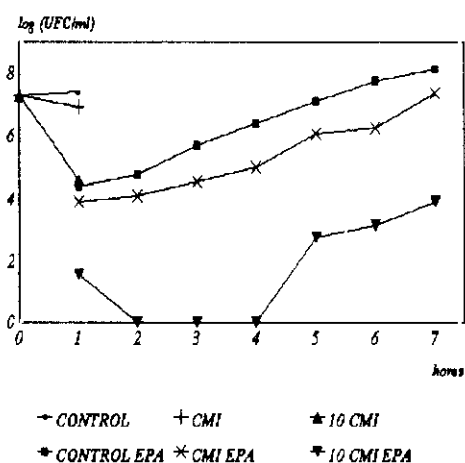


Fig. 15: EPA de tobramicina a CMI y 10 CMI frente a *S. aureus* ATCC 29213.

### 1.2.3.- Efecto sobre el crecimiento de *S. epidermidis* ATCC 12228 tras la exposición durante una hora a varios antimicrobianos

**Ofloxacino:** con un inóculo de  $10^7$  UFC/ml, presentó un EPA de 0'8 horas a CMI, que se prolongó a 2'4 horas a 10 CMI, observando que los cultivos empezaban a recuperarse entre la 5ª y la 6ª hora de seguimiento, en este último caso.

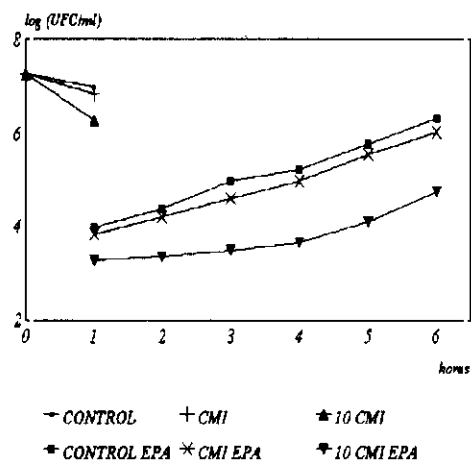


Fig. 16: EPA de ofloxacino a CMI y 10 CMI frente a *S. epidermidis* ATCC 12228.

**Tiamfenicol:** con un inóculo de  $10^7$  UFC/ml, presentó un EPA de 1'3 horas a CMI y de 1'5 horas a 5 CMI, observando que los cultivos empezaban a recuperarse entre la 4ª y la 5ª hora de seguimiento, en ambos casos.

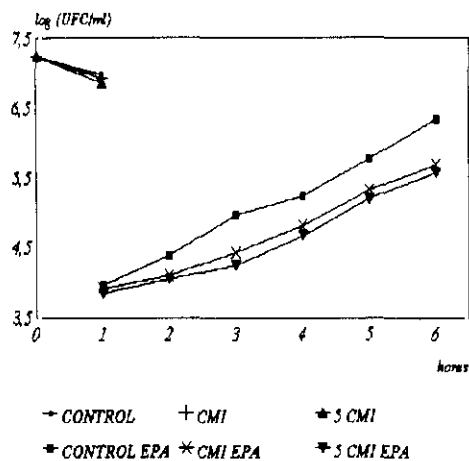


Fig. 17: EPA de tiamfenicol a CMI y 5 CMI frente a *S. epidermidis* ATCC 12228.

**Rifampicina:** con un inóculo de  $10^7$  UFC/ml, presentó un EPA de 1'9 horas a CMI. A 10 CMI no encontramos recuperación de los cultivos después de 8 horas de seguimiento, pudiendo decir que el EPA será mayor de 5'1 horas.

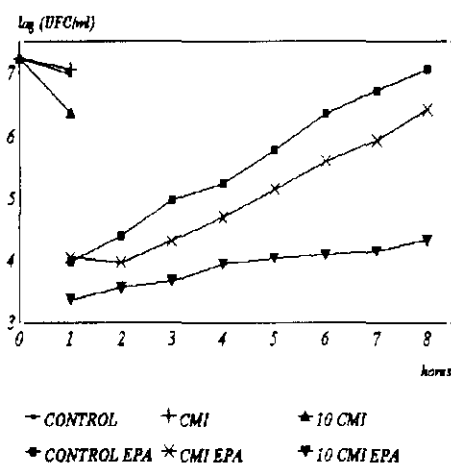


Fig. 18: EPA de rifampicina a CMI y 10 CMI frente a *S. epidermidis* ATCC 12228.

**Gentamicina:** con un inóculo de  $10^7$  UFC/ml, mostró un EPA poco significativo, de 0'7 horas, a CMI, que se prolongó a 1'7 horas a 5 CMI. A 10 CMI no pudo determinarse el EPA debido a la marcada actividad bactericida del antibiótico frente a esta bacteria a esta concentración.

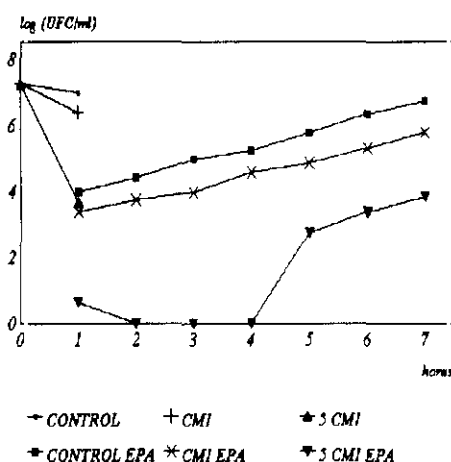


Fig. 19: EPA de gentamicina a CMI y 5 CMI frente a *S. epidermidis* ATCC 12228.

**Tobramicina:** con un inóculo de  $10^7$  UFC/ml, presentó un EPA de 2'5 horas a CMI. A 5 y 10 CMI no pudo determinarse el EPA debido a la marcada actividad bactericida del antibiótico frente a esta bacteria a estas concentraciones.

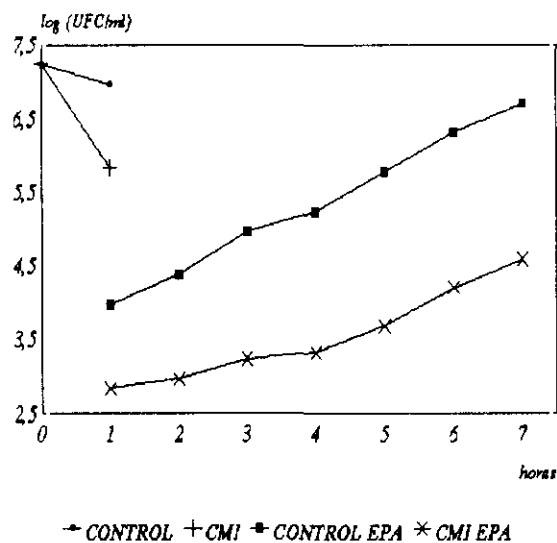


Fig. 20: EPA de tobramicina a CMI frente a *S. epidermidis* ATCC12228.

#### 1.2.4.- Efecto sobre el crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 tras la exposición durante una hora a varios antimicrobianos

**Ofloxacino:** con un inóculo de  $10^7$  UFC/ml, no encontramos EPA a CMI. A 10 CMI no observamos recuperación de los cultivos después de 6 horas de seguimiento, pudiendo decir que el EPA será mayor de 3'2 horas.

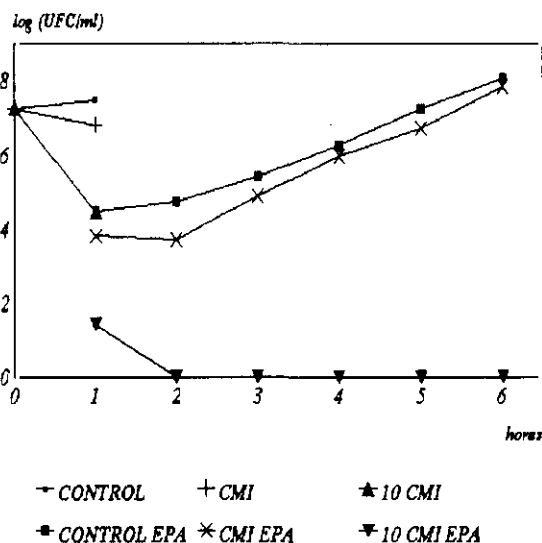


Fig. 21: EPA de ofloxacino a CMI y 10 CMI frente a *E. coli* ATCC 25922.

Rifampicina: con un inóculo de  $10^7$  UFC/ml, presentó un EPA de 1'5 horas a CMI. Con concentraciones de 4 CMI, 10 CMI y 40 CMI no encontramos recuperación de los cultivos después de 7 horas de seguimiento, pudiendo decir que el EPA será mayor de 4'2 horas en los 3 casos.

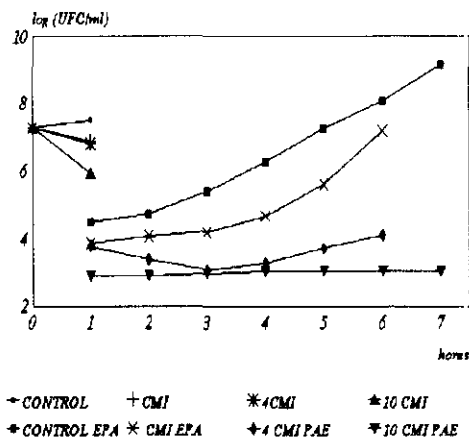


Fig. 22: EPA de rifampicina a CMI, 4 CMI y 10 CMI frente a E. coli ATCC 25922.

Gentamicina: con un inóculo de  $10^7$  UFC/ml, no encontramos EPA a CMI. A 10 CMI el EPA fue de 2'2 horas, observándose una recuperación de los cultivos a partir de la 5ª hora de seguimiento.

Tobramicina: con un inóculo de  $10^7$  UFC/ml, no encontramos EPA a CMI. A 10 CMI el EPA fue de 2'1 horas, observándose una recuperación de los cultivos entre la 4ª y la 5ª hora de seguimiento.

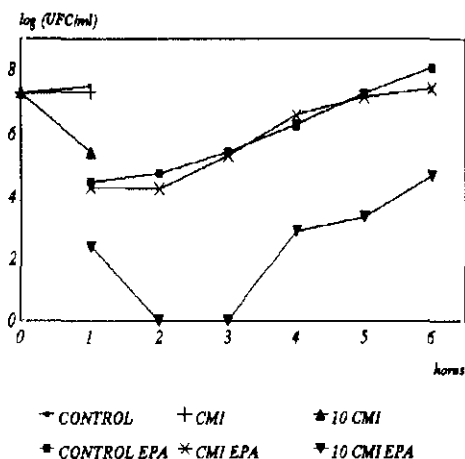


Fig. 23: EPA de gentamicina a CMI y 10 CMI frente a E. coli ATCC 25922.

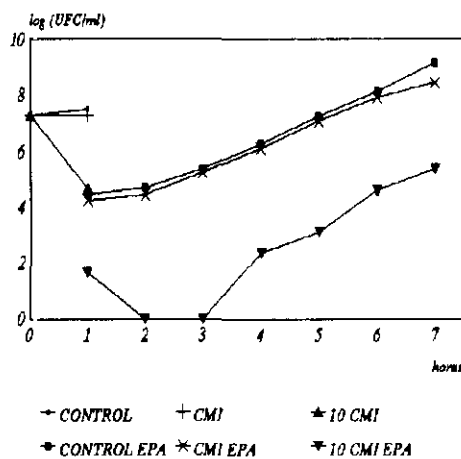


Fig. 24: EPA de tobramicina a CMI y 10 CMI frente a E. coli ATCC 25922.

### 1.2.5.- Efecto sobre el crecimiento de *P. vulgaris* ATCC 13315 tras la exposición durante una hora a varios antimicrobianos

**Ofloxacino:** con un inóculo de  $10^7$  UFC/ml presentó un EPA de 3 horas a CMI. Con concentraciones de  $6,8 \mu\text{g/ml}$  se obtuvo un EPA de 3,5 horas, observando que los cultivos empezaban a recuperarse entre la 6ª y la 7ª hora de seguimiento.

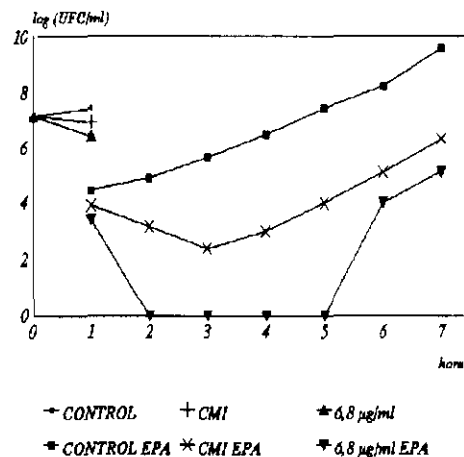


Fig. 25: EPA de ofloxacino a CMI y  $6,8 \mu\text{g/ml}$  frente a *P. vulgaris* ATCC 13315.

**Tiamfenicol:** con un inóculo de  $10^7$  UFC/ml, presentó un EPA de 1,5 horas a CMI y de 1,7 horas a 10 CMI, observando que los cultivos empezaban a recuperarse entre la 4ª y la 5ª hora de seguimiento, en ambos casos.

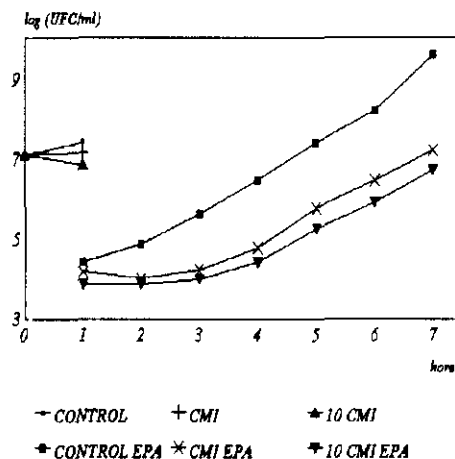


Fig. 26: EPA de tiamfenicol a CMI y 10 CMI frente a *P. vulgaris* ATCC 13315.

**Rifampicina:** con un inóculo de  $10^7$  UFC/ml, presentó un EPA de 1,7 horas a CMI, observándose una recuperación de los cultivos entre la 4ª y la 5ª hora de seguimiento.

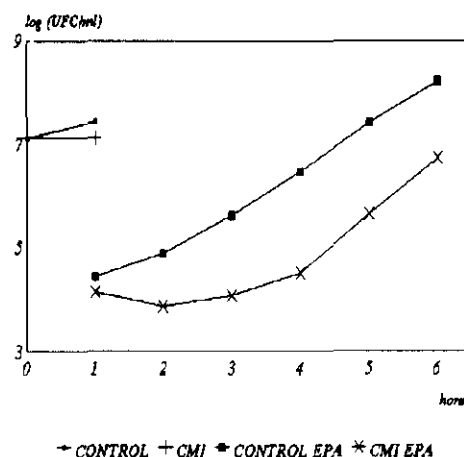


Fig. 27: EPA de rifampicina a CMI frente a *P. vulgaris* ATCC 13315.

Gentamicina: con un inóculo de  $10^7$  UFC/ml, no encontramos EPA a CMI. A 10 CMI el EPA fue de 1'7 horas, observándose una recuperación de los cultivos a partir de la 4ª hora de seguimiento.

Tobramicina: con un inóculo de  $10^7$  UFC/ml, no encontramos EPA a CMI, ni a 10 CMI.

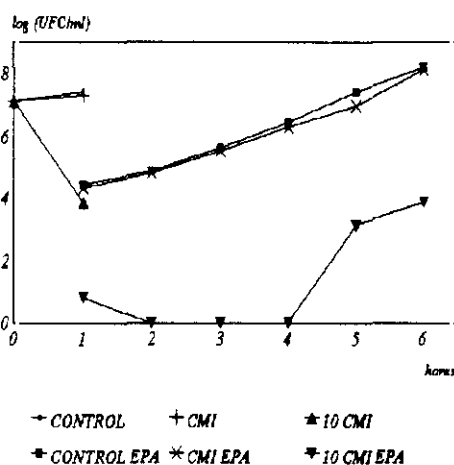


Fig. 28: EPA de gentamicina a CMI y 10 CMI frente a *P. vulgaris* ATCC 13315.

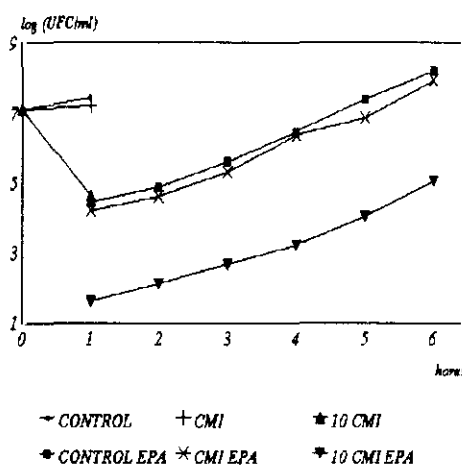


Fig. 29: EPA de tobramicina a CMI y 10 CMI frente a *P. vulgaris* ATCC 13315.

### 1.2.6.- Efecto sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* ATCC 9721 tras la exposición durante una hora a varios antimicrobianos

Ofloxacino: con un inóculo de  $10^7$  UFC/ml, presentó un EPA de 1 hora a CMI. Con concentraciones de 10 CMI se observó una recuperación de los cultivos a partir de la 7ª hora de seguimiento, pudiendo decir que el EPA será mayor a 5 horas.

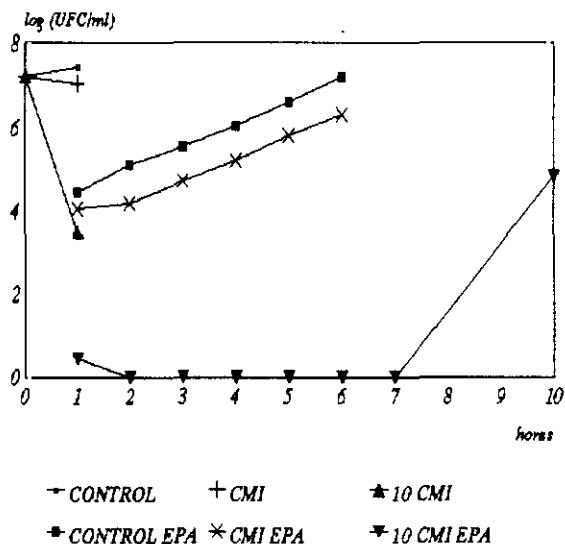


Fig. 30: EPA de ofloxacino a CMI y 10 CMI frente a *P. aeruginosa* ATCC 9721.

**Tiamfenicol:** con un inóculo de  $10^6$  UFC/ml, presentó un EPA de 1 hora a CMI. A 10 CMI el EPA fue de 1'6 horas, observándose una recuperación de los cultivos a partir de la 4ª hora de seguimiento.

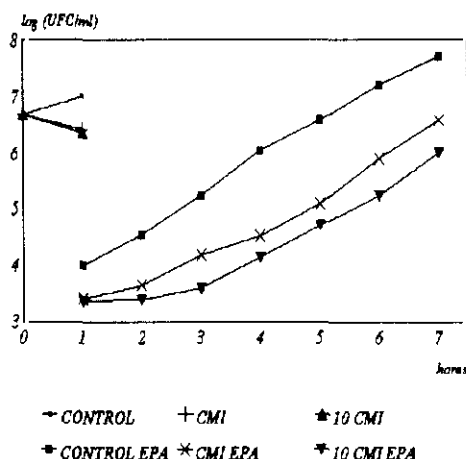


Fig. 31: EPA de tiamfenicol a CMI y 10 CMI frente a *P. aeruginosa* ATCC9721.

**Rifampicina:** con un inóculo de  $10^7$  UFC/ml, presentó un EPA de 2'7 horas a CMI. A 10 CMI el EPA fue de 4'6 horas, observándose una recuperación de los cultivos a partir de la 7ª hora de seguimiento.

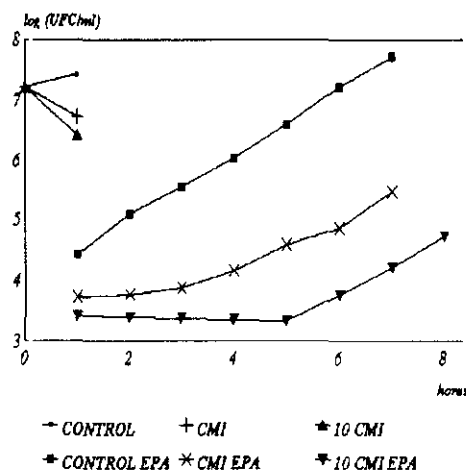


Fig. 32: EPA de rifampicina a CMI y 10 CMI frente a *P. aeruginosa* ATCC9721.

**Gentamicina:** con un inóculo de  $10^7$  UFC/ml, presentó un EPA de 2 horas a CMI. Con concentraciones de 10 CMI se observó una recuperación de los cultivos a partir de la 8ª hora de seguimiento, pudiendo decir que el EPA será mayor a 5 horas.

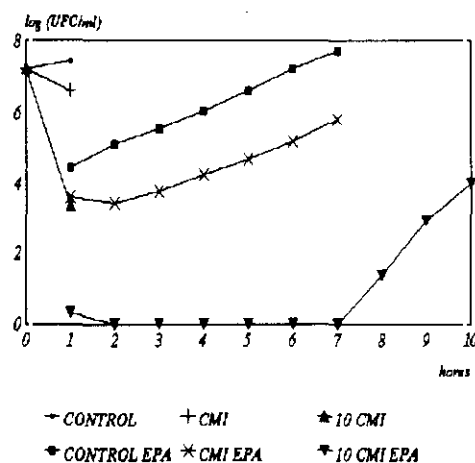


Fig. 33: EPA de gentamicina a CMI y 10 CMI frente a *P. aeruginosa* ATCC9721.

Tobramicina: con un inóculo de  $10^7$  UFC/ml, presentó un EPA de 1 hora a CMI. A 10 CMI el EPA fue de 3 horas, observándose una recuperación de los cultivos entre la 5ª y la 6ª hora de seguimiento.

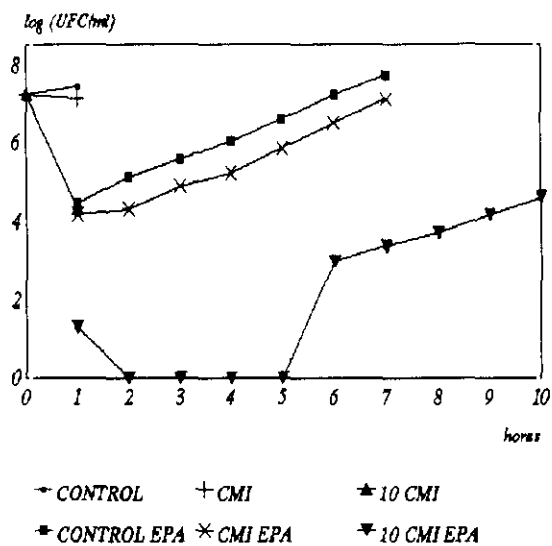


Fig. 34: EPA de tobramicina a CMI y 10 CMI frente a *P. aeruginosa* ATCC 9721.

En las Tablas 3-8 se detallan los valores del EPA.

ANTIBIÓTICO	CMi µg/ml	Concentración µg/ml	EPA-ES horas
Ofloxacino	4	4	-
		6'8	1'1 ± 0'1
		40	3'1 ± 0'1
Tiamfenicol	2	2	0'9 ± 0'08
		20	2 ± 0'03
Rifampicina	0'03	0'03	0'5 ± 0'1
		0'3	1'9 ± 0'1
Gentamicina	4	4	0'6 ± 0'1
		40	≥5 ± 1
Tobramicina	8	8	0'9 ± 0'05
		80	3'4 ± 0'3

Tabla 3: Efecto postantibiótico de ofloxacino, tiamfenicol, rifampicina, gentamicina y tobramicina frente a *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6303.

ANTIBIÓTICO	CMi µg/ml	Concentración µg/ml	EPA-ES horas
Ofloxacino	0'5	0'25	-
		0'5	0'5 ± 0'3
		2'5	1'3 ± 0'1
		5	1'9 ± 0'4
Tiamfenicol	32	32	1'1 ± 0'1
		320	2'9 ± 0'1
Rifampicina	0'015	0'015	0'9 ± 0'3
		0'15	≥3'3 ± 0'1
Gentamicina	0'25	0'25	0'5 ± 0'2
		2'5	2'1 ± 0'2
Tobramicina	0'25	0'25	1'9 ± 0'2
		2'5	2'2 ± 0'4

Tabla 4: Efecto postantibiótico de ofloxacino, tiamfenicol, rifampicina, gentamicina y tobramicina frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

ANTIBIÓTICO	CMi µg/ml	Concentración µg/ml	EPA-ES horas
Ofloxacino	0'5	0'5	0'8 ± 0'1
		5	2'4 ± 0'1
Tiamfenicol	4	4	1'3 ± 0'1
		20	1'5 ± 0'4
Rifampicina	0'015	0'015	1'9 ± 0'1
		0'15	>5'1
Gentamicina	0'12	0'12	0'7 ± 0'1
		0'6	1'7 ± 0'1
Tobramicina	0'25	0'25	2'5 ± 0'1

Tabla 5: Efecto postantibiótico de ofloxacino, tiamfenicol, rifampicina, gentamicina y tobramicina frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

ANTIBIÓTICO	CMI µg/ml	Concentración µg/ml	EPAs-ES horas
Ofloxacino	0'03	0'03	0'2 ± 0'2
		0'3	≥3'2 ± 0'2
Rifampicina	8	8	1'5 ± 0'2
		32	≥4'2 ± 0'2
		80	≥4'2 ± 0'2
Gentamicina	0'5	0'5	0'2 ± 0'2
		5	2'2 ± 0'2
Tobramicina	0'5	0'5	0
		5	2'1 ± 0'4

Tabla 6: Efecto postantibiótico de ofloxacino, rifampicina, gentamicina y tobramicina frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.

ANTIBIÓTICO	CMI µg/ml	Concentración µg/ml	EPAs-ES horas
Ofloxacino	0'06	0'06	3 ± 0'1
		6'8	3'5 ± 0'1
Tiamfenicol	32	32	1'5 ± 0'2
		320	1'7 ± 0'2
Rifampicina	16	16	1'7 ± 0'2
Gentamicina	0'12	0'12	0
		1'2	1'7 ± 0'1
Tobramicina	0'12	0'12	0
		1'2	0

Tabla 7: Efecto postantibiótico de ofloxacino, tiamfenicol, rifampicina, gentamicina y tobramicina frente a *Proteus vulgaris* ATCC 13315.

ANTIBIÓTICO	CMI µg/ml	Concentración µg/ml	EPAs-ES horas
Ofloxacino	0'5	0'5	1 ± 0'2
		5	5 ± 0'2
Tiamfenicol	64	64	1 ± 0'1
		640	1'6 ± 0'1
Rifampicina	32	32	2'7 ± 0'4
		320	4'6 ± 0'1
Gentamicina	1	1	2 ± 0'5
		10	5 ± 0'2
Tobramicina	0'25	0'25	1 ± 0'3
		2'5	3 ± 0'1

Tabla 8: Efecto postantibiótico de ofloxacino, tiamfenicol, rifampicina, gentamicina y tobramicina frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9721.

---

## 2.- RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS *IN VIVO*

### 2.1.- MODELO EXPERIMENTAL DE QUERATITIS BACTERIANA EN CONEJOS POR *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* Y *PROTEUS VULGARIS*. TRATAMIENTO CON OFLOXACINO

#### 2.1.1.- Resultados clínicos

##### 2.1.1.1.- Ensayo con *S. pneumoniae* (Tabla 9)

Control: todas las córneas presentaron un edema intenso asociado a la formación de un leucoma mayor de 4 mm que impedía la visualización de la cámara anterior durante todo el tiempo de estudio, aunque en el tercer día destaca la formación de hipopión en un caso. Observamos aumento de la neovascularización en la segunda semana y persistencia de las úlceras de 2-4 mm de diámetro y deformación corneal leve en el decimoquinto día.

En conjuntiva apreciamos una hiperemia conjuntival y ciliar entre moderada e intensa durante las dos semanas, aunque la quemosis y secreción se hacen leves al final del estudio. Todos los ojos evolucionaron hacia la *ptisis bulbi*.

Profilaxis: el edema corneal fue leve en todos los casos desapareciendo en el decimoquinto día. Se observó formación de un leucoma menor de 2 mm junto a una neovascularización que no llegó a afectar a un cuadrante durante todo el período de estudio. La úlcera que no alcanza los 2 mm ha desaparecido en un tercio de los casos en el séptimo día y lo mismo ocurre con la deformación corneal, que de ser leve pasa a no existir al final de las dos semanas.

No se evidenció afectación uveal en ningún momento. La hiperemia conjuntival y ciliar, entre leve y moderada los tres primeros días, tiende a desaparecer hacia el séptimo

---

día en que ya no se observa quemosis, siendo todos los parámetros conjuntivales normales en todos los casos al final del estudio.

Tratamiento: el edema corneal fue moderado en dos tercios de los casos entre el tercero y séptimo día, llegando a desaparecer en todos los casos excepto en uno al final de las dos semanas. Se observó persistencia de leucoma menor a 2 mm y neovascularización que no afectaba a un cuadrante en todos los casos al final del estudio. La úlcera de 2-4 mm de diámetro inicia su mejoría, al igual que la deformación corneal, a partir del séptimo día y en el decimoquinto ambas han desaparecido en todos los casos.

No se observó reacción uveal en ningún momento. La hiperemia conjuntival y ciliar fueron intensa y moderada, respectivamente, durante la primera semana, apreciándose quemosis y secreción leves, pero al final del tratamiento todos estos parámetros se han normalizado en todos los casos.

#### 2.1.1.2.- Ensayo con *P. vulgaris* (Tabla 10)

Control: todas las córneas presentaron un edema entre moderado e intenso asociado a la formación de un leucoma entre 2 y  $\geq 4$  mm de diámetro que no permitió la visualización de la cámara anterior, aunque, también en un caso y en el tercer día, destaca la formación de hipopión. Observamos aumento de la neovascularización importante en la segunda semana y persistencia de las úlceras de 2-4 mm de diámetro y deformación corneal leve en el decimoquinto día.

En conjuntiva apreciamos una hiperemia conjuntival y ciliar intensa y quemosis y secreción moderadas en la primera semana, que evolucionan hacia una menor intensidad -moderada y leve, respectivamente- en la segunda semana. Todos los ojos evolucionaron hacia la *ptisis bulbi*.

Profilaxis: el edema corneal fue leve en todos los casos, desapareciendo en el decimoquinto día. Se observó formación de un leucoma menor a 2 mm sin neovascularización, que persistió durante todo el estudio. La úlcera de 2-4 mm de diámetro en el tercer día tiende a disminuir su tamaño, de forma que a partir del séptimo día ha cerrado en todos los casos menos en uno y es inexistente al final del tratamiento. Lo mismo ocurre con la deformación corneal, que de ser leve pasa a no existir al final de las dos semanas.

No se evidenció afectación uveal en ningún momento. La hiperemia conjuntival y ciliar entre leve y moderada los tres primeros días, tiende a desaparecer hacia el séptimo día y la quemosis y secreción conjuntivales no se detectan desde el tercer día de la evolución.

Tratamiento: el edema corneal fue moderado entre el tercero y séptimo día, persistiendo de forma leve al final de las dos semanas. Se observó un leucoma residual menor a 2 mm y discreta neovascularización en todos los casos al final del estudio. La úlcera de 2-4 mm de diámetro inicia su mejoría, al igual que la deformación corneal, a partir del séptimo día y en el decimoquinto ambas han desaparecido en todos los casos.

No se observó reacción uveal en ningún momento. La hiperemia conjuntival y ciliar fueron moderada e intensa, respectivamente, durante la primera semana, apreciándose quemosis y secreción leves. Al final del tratamiento todos estos parámetros se han normalizado en todos los casos excepto en uno, en el que persiste hiperemia conjuntival leve.

OFLOXACINO	CONTROL			PRÓFILAXIS			TRATAMIENTO		
	3 <sup>er</sup> d	7 <sup>o</sup> d	15 <sup>o</sup> d	3 <sup>er</sup> d	7 <sup>o</sup> d	15 <sup>o</sup> d	3 <sup>er</sup> d	7 <sup>o</sup> d	15 <sup>o</sup> d
<b>CÓRNEA</b>									
Edema	3	3	3	0-1	0-1	0	2	1	0-1
Leucoma	3	3	3	1	0-1	0-1	2-3	1-2	1
Neovascularización	0	1-2	2-3	0	0-1	0-1	0	0-1	1
Úlcera	3	2-3	1-2	0-1	0-1	0	2-3	0-1	0
Deformación	1-2	1	1	0-1	0-1	0	1	0-1	0
<b>CÁMARA ANTERIOR</b>									
Tindall	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipopión	0-1	-	-	0	0	0	0	0	0
Hifema	0	-	-	0	0	0	0	0	0
Formación de fibrina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>IRIS</b>									
Hiperemia	0	-	-	0	0	0	0	0	0
Irregularidad pupilar	0	-	-	0	0	0	0	0	0
Sinequias	0	-	-	0	0	0	0	0	0
<b>CONJUNTIVA</b>									
Hiperemia conjuntival	2-3	3	2-3	1-2	0-1	0	3	2	0
Hiperemia ciliar	2	2-3	2-3	1-2	0-1	0	2-3	2	0
Quemosis	1-2	1-2	1	1-2	0	0	1	0	0
Secreción	2-3	1-2	1	1-2	0-1	0	1	0-1	0

Tabla 9: Queratitis por *S. pneumoniae* ATCC 6303. Ensayo con ofloxacino. Resultados clínicos.

OFLOXACINO	CONTROL			PRÓFILAXIS			TRATAMIENTO		
	3 <sup>er</sup> d	7 <sup>o</sup> d	15 <sup>o</sup> d	3 <sup>er</sup> d	7 <sup>o</sup> d	15 <sup>o</sup> d	3 <sup>er</sup> d	7 <sup>o</sup> d	15 <sup>o</sup> d
<b>CÓRNEA</b>									
Edema	2-3	2-3	2	2	0-1	0	1-2	1	0-1
Leucoma	1-2	2-3	2-3	1-2	1	1	1-2	1	1
Neovascularización	0	2-3	2-3	0	0	0	0	0-1	1
Úlcera	2-3	2-3	1-2	1-2	0-1	0	1-2	1-2	0
Deformación	0-1	1	1	0-1	0-1	0	1-2	0-1	0
<b>CÁMARA ANTERIOR</b>									
Tindall	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipopión	0-1	-	-	0	0	0	0	0	0
Hifema	0	-	-	0	0	0	0	0	0
Formación de fibrina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>IRIS</b>									
Hiperemia	0	-	-	0	0	0	0	0	0
Irregularidad pupilar	0	-	-	0	0	0	0	0	0
Sinequias	0	-	-	0	0	0	0	0	0
<b>CONJUNTIVA</b>									
Hiperemia conjuntival	3	3	1-2	1-2	1	0-1	2	1	0-1
Hiperemia ciliar	3	2	1-2	1-2	1	0	2-3	2	0
Quemosis	2-3	1-2	1	1	0	0	1	0-1	0
Secreción	1-2	1	1	1	0	0	1	0-1	0

Tabla 10: Queratitis por *P. vulgaris* ATCC 13315. Ensayo con ofloxacino. Resultados clínicos.

---

## 2.1.2. - **Resultados microbiológicos**

### 2.1.2.1. - **Ensayo con *S. pneumoniae*** (Tabla 11)

**Control:** al tercer día el 66'6% de los cultivos corneales son positivos para *S. pneumoniae*; al séptimo día el porcentaje disminuye a un 33'3% y aislamos *Staphylococcus spp.* en el 33'3% de las conjuntivas. En el decimoquinto día todos los cultivos son negativos para *S. pneumoniae* y aislamos *Staphylococcus spp.* en el 33'3% de las córneas y en el 66'6% de las conjuntivas.

**Profilaxis:** todos los cultivos son negativos para *S. pneumoniae* durante todo el estudio, aislándose *Staphylococcus spp.* en el 16'6% de las conjuntivas en el tercer día, en el 16'6% de las córneas y 50% de las conjuntivas en el séptimo día y en el 66'6% de las córneas y 33'3% de las conjuntivas en el decimoquinto día.

**Tratamiento:** los cultivos son positivos en el 33'3% de las córneas para *S. pneumoniae* en el tercer día; el séptimo y decimoquinto día todos los cultivos son negativos para *S. pneumoniae*, pero encontramos contaminación por *Staphylococcus spp.* en el 83'3% de las conjuntivas en el séptimo día y un 50% de las córneas al final del estudio.

### 2.1.2.2. - **Ensayo con *P. vulgaris*** (Tabla 12)

**Control:** al tercer día todos los cultivos de córnea y conjuntiva son positivos para *P. vulgaris*; en el séptimo día este porcentaje ha descendido a un 33'3% tanto en córnea como en conjuntiva, aislándose contaminación por *Staphylococcus spp.* en el 33'3 % de las córneas y en el 66'6% de las conjuntivas; en el decimoquinto día todos los cultivos son negativos para *P. vulgaris*, aislándose *Staphylococcus spp.* en el 66'6% de las córneas y en el 100% de las conjuntivas.

Profilaxis: todos los cultivos son negativos para *P. vulgaris* durante todo el estudio; y sólo en el séptimo día se aísla *Staphylococcus spp.* en el 33'3% de las muestras de córnea y en el 83'3% de las de conjuntiva.

Tratamiento: al tercer día un conejo ha muerto y los cultivos son positivos en el 50% de las córneas y en el 33'3% de las conjuntivas para *P. vulgaris*, encontrándose, además, en conjuntiva un 16'6% de cultivos contaminados por *Staphylococcus spp.* En el séptimo día sólo hay un 16'6% de positividad para *P. vulgaris* en la córnea y se aísla *Staphylococcus spp.* en el 33'3% de las mismas; en conjuntiva el aislamiento de estafilococos alcanza un 66'6%. En el decimoquinto día todos los cultivos son negativos para *P. vulgaris*, y encontramos *Staphylococcus spp.* en el 66'6% de las córneas y conjuntivas.

OFLOXACINO	CONTROL	PROFILAXIS	TRATAMIENTO
Cultivo 3 <sup>er</sup> día	+ (66'6 %)	-	+ (33'3 %)
Cultivo 7 <sup>o</sup> día	+ (33'3 %)	-	-
Cultivo 15 <sup>o</sup> día	-	-	-

Tabla 11: Queratitis por *S. pneumoniae* ATCC 6303. Ensayo con ofloxacino. Resultados microbiológicos.

OFLOXACINO	CONTROL	PROFILAXIS	TRATAMIENTO
Cultivo 3 <sup>er</sup> día	+ (100 %)	-	+ (50 %)
Cultivo 7 <sup>o</sup> día	+ (33'3 %)	-	+ (16'6 %)
Cultivo 15 <sup>o</sup> día	-	-	-

Tabla 12: Queratitis por *P. vulgaris* ATCC 13315. Ensayo con ofloxacino. Resultados microbiológicos.

---

## 2.2.- MODELO EXPERIMENTAL DE QUERATITIS BACTERIANA EN CONEJOS POR *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*. TRATAMIENTO CON TIAMFENICOL Y TOBRAMICINA.

### 2.2.1.- Resultados clínicos (Tablas 13 y 14)

#### 2.2.1.1.- Grupo placebo

Profilaxis: todas las córneas presentaron un edema entre moderado e intenso asociado a la formación de un leucoma mayor de 4 mm de diámetro que impedía la visualización de la cámara anterior durante todo el tiempo de estudio, aunque en el tercer día se puede apreciar la formación de hipopión. Observamos aumento de la neovascularización mayor a dos cuadrantes en la segunda semana y persistencia de las úlceras de 2-4 mm de diámetro y deformación corneal moderada en el decimoquinto día.

En conjuntiva apreciamos una hiperemia conjuntival y ciliar intensa en el tercer día que se hacen moderadas en el séptimo día y leves al final de las dos semanas, aunque la quemosis y secreción se mantienen entre leves y moderadas durante todo el tiempo de seguimiento.

Tratamiento: todas las córneas presentaron un edema intenso asociado a la formación de un leucoma mayor de 4 mm que impedía la visualización de la cámara anterior durante todo el tiempo de estudio. Observamos aumento de la neovascularización en la segunda semana y persistencia de las úlceras de 2-4 mm de diámetro y deformación corneal entre leve y moderada en el decimoquinto día.

En conjuntiva apreciamos una hiperemia conjuntival moderada y ciliar intensa en el tercer día, que mejoran en la segunda semana y son leves en el decimoquinto día. La quemosis y secreción, más importantes en el tercer día, se hacen leves al final del estudio.

### 2.2.1.2.- Grupo tobramicina

Profilaxis: el edema corneal fue moderado entre el tercer y séptimo día desapareciendo en todos los casos en el decimoquinto día. Se observó formación de un leucoma entre 2 y 4 mm de diámetro junto a una neovascularización que afectó a más de dos cuadrantes en el séptimo día, con persistencia de un leucoma residual leve y menor neovascularización al final de las dos semanas. La úlcera de 2-4 mm de diámetro en el tercer día, cicatriza en todos los casos a partir del séptimo día.

En los tres primeros días encontramos una reacción uveal leve junto a una hiperemia conjuntival y ciliar moderada e intensa, respectivamente, quemosis leve y secreción moderada. En el séptimo día tan sólo se aprecia una hiperemia conjuntival y ciliar leve. En el decimoquinto día todos los parámetros conjuntivales se han normalizado.

Tratamiento: el edema corneal fue moderado entre el tercero y séptimo día, persistiendo de forma leve al final de las dos semanas. Se observó un leucoma residual menor de 2 mm y neovascularización que no afectaba a un cuadrante en todos los casos al final del estudio. La úlcera < 2 mm de diámetro en el tercer día, cicatriza en todos los casos a partir del séptimo día.

Apenas existe reacción uveal. La hiperemia conjuntival y ciliar fue entre moderada e intensa en el tercer día, disminuyendo en la segunda semana hasta desaparecer al final del estudio. La quemosis y secreción moderadas al principio mejoran al final del tratamiento, quedando sólo una pequeña secreción conjuntival.

### 2.2.1.3.- Grupo tiamfenicol

Profilaxis: el edema corneal fue entre leve y moderado en el tercer día, desapareciendo en todos los casos en el decimoquinto. Se observó formación de un leucoma entre 2 y 4 mm de diámetro en el tercer día junto a neovascularización moderada en la segunda semana y leucoma residual leve al final de las dos semanas. Las úlceras de 2-4 mm de diámetro inician su cicatrización a partir del séptimo día, habiéndose cerrado todas al final del estudio y no apreciándose en ningún momento deformidad corneal.

La hiperemia conjuntival y ciliar entre leve y moderada los tres primeros días, tiende a desaparecer hacia el séptimo día en que ya no se observa quemosis, pero sí secreción leve. Todos los parámetros conjuntivales son normales en todos los casos al final del estudio.

Tratamiento: el edema corneal fue moderado durante la primera semana y persistió de forma leve en la segunda. Se observó persistencia de leucoma entre 2 y 4 mm de diámetro y neovascularización intensa en el séptimo día, que abarca a uno ó dos cuadrantes en todos los casos al final del estudio. La úlcera de 2-4 mm de diámetro inicia su mejoría, al igual que la deformación corneal, a partir del séptimo día, y en el decimoquinto ambas han desaparecido en todos los casos.

Apenas existe afectación uveal. La hiperemia conjuntival y ciliar fueron entre moderadas e intensas los tres primeros días, apreciándose también quemosis y secreción moderadas. En el séptimo día la afectación conjuntival en general es leve sin quemosis y al final del estudio todos estos parámetros se han normalizado a excepción de una pequeña secreción.

PROFILAXIS	P	ACE	O	TOB	AMI	INA	TIA	IFEN	COL
	3 <sup>er</sup> d	7 <sup>o</sup> d	15 <sup>o</sup> d	3 <sup>er</sup> d	7 <sup>o</sup> d	15 <sup>o</sup> d	3 <sup>er</sup> d	7 <sup>o</sup> d	15 <sup>o</sup> d
<b>CÓRNEA</b>									
Edema	2	2-3	2-3	1-2	2	0	1-2	1	0
Leucoma	2-3	3	3	1-2	2	1-2	2	1	1-2
Neovascularización	0	3	3	0	3	1-2	0	1-2	1-2
Úlcera	1	2	2	1-2	0	0	1-2	0-1	0
Deformación	0	1	2	0	0-1	0	0	0	0
<b>CÁMARA ANTERIOR</b>									
Tindall	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipopión	2	-	-	1	0	0	0	0	0
Hifema	0	-	-	0	0	0	0	0	0
Formación de fibrina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>IRIS</b>									
Hiperemia	1	-	-	1-2	0-1	0	1	0	0
Irregularidad pupilar	0	-	-	0	0	0	0	0	0
Sinequias	0	-	-	0	0	0	0	0	0
<b>CONJUNTIVA</b>									
Hiperemia conjuntival	2-3	2	1	2	0-1	0	1-2	0	0
Hiperemia ciliar	3	2	1	2-3	0-1	0	2	0-1	0
Quemosis	1-2	1-2	1	1	0	0	1	0	0
Secreción	1-2	2	2	2	0	0	1-2	0-1	0

Tabla 13: Queratitis por *S. pneumoniae* ATCC 6303. Grupo Profilaxis. Resultados clínicos.

TRATAMIENTO	P	ACE	O	TOB	AMI	INA	TIA	IFEN	COL
	3 <sup>er</sup> d	7 <sup>o</sup> d	15 <sup>o</sup> d	3 <sup>er</sup> d	7 <sup>o</sup> d	15 <sup>o</sup> d	3 <sup>er</sup> d	7 <sup>o</sup> d	15 <sup>o</sup> d
<b>CÓRNEA</b>									
Edema	2-3	3	3	1	1-2	1	2	2	1
Leucoma	2-3	3	3	1-2	1-2	1	2	2	1-2
Neovascularización	0	3	3	0	1	1	0	3	2
Úlcera	1-2	2	2	1	0	0	2	0-1	0
Deformación	0	1	1-2	0	0-1	0	0	0-1	0
<b>CÁMARA ANTERIOR</b>									
Tindall	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipopión	-	-	-	0-1	0	0	0	0	0
Hifema	-	-	-	0	0	0	0	0	0
Formación de fibrina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>IRIS</b>									
Hiperemia	-	-	-	1	0-1	0	0-1	0-1	0
Irregularidad pupilar	-	-	-	0	0	0	0	0	0
Sinequias	-	-	-	0	0	0	0	0	0
<b>CONJUNTIVA</b>									
Hiperemia conjuntival	2	1-2	1	2	1	0	2-3	0-1	0
Hiperemia ciliar	3	2	1	3	1	0	3	1	0
Quemosis	2	1	0-1	1-2	0-1	0	2	0	0
Secreción	2-3	1-2	1-2	2	1-2	0-1	2	1	0-1

Tabla 14: Queratitis por *S. pneumoniae* ATCC 6303. Grupo Tratamiento. Resultados clínicos.

---

## 2.2.2.- Resultados microbiológicos (Tablas 15 y 16)

### 2.2.2.1.- Grupo placebo

Profilaxis: al tercer día los cultivos son positivos en el 66'6% de las córneas y conjuntivas para *S. pneumoniae*, encontramos sobreinfección por *S. epidermidis* en el 16'6% de las conjuntivas. En el séptimo día se negativizan todos los cultivos y en el decimoquinto un conejo ha muerto y aislamos *Staphylococcus spp.* en el 16'6% de las córneas y en el 50% de las conjuntivas.

Tratamiento: al tercer día los cultivos son positivos para *S. pneumoniae* en el 16'6% de las muestras de córnea y conjuntiva, además, en conjuntiva un 33'3% de los cultivos son positivos para *Staphylococcus spp.*; al séptimo día un conejo ha muerto y persiste el mismo porcentaje de positividad para *S. pneumoniae* tanto en córnea como en conjuntiva hasta el final del estudio, con sobreinfección por *Staphylococcus spp.* en córnea en el decimoquinto día.

### 2.2.2.2.- Grupo tobramicina

Profilaxis: todos los cultivos de córnea y conjuntiva son negativos para *S. pneumoniae* durante todo el estudio; únicamente encontramos contaminación por *Staphylococcus spp.* en el 16'6% de las conjuntivas al tercer día.

Tratamiento: al tercer día el 16'6% de los cultivos corneales y conjuntivales son positivos para *S. pneumoniae*, encontrando además en conjuntiva un 16'6% de cultivos positivos para *Staphylococcus spp.* Posteriormente todos los cultivos son negativos.

### 2.2.2.3.- Grupo tiamfenicol

**Profilaxis:** al tercer día el 83'3% de los cultivos corneales y el 50% de los conjuntivales son positivos para *S. pneumoniae*. Al séptimo día se negativizan todos y en el decimoquinto día persiste la negativización en cuanto a los cultivos corneales; sin embargo, en conjuntiva encontramos un 16'6% de positividad para *S. pneumoniae* y contaminación por *Staphylococcus spp.* en el 33'3% de las mismas.

**Tratamiento:** al tercer día el 33'3% de los cultivos corneales son positivos para *S. pneumoniae* y el 33'3% de los cultivos conjuntivales son positivos para *Staphylococcus spp.* En el séptimo día todos los cultivos son negativos y al final del estudio los cultivos corneales siguen siendo negativos, pero en conjuntiva encontramos infección mixta por *S. pneumoniae* y *Staphylococcus spp.* en el 33'3% de los casos, y contaminación por *Staphylococcus spp.* en un 16'6% de los cultivos.

PROFILAXIS	PLACEBO	TOBRAMICINA	TIAMFENICOL
Cultivo 3 <sup>er</sup> día	+ (66'6 %)	-	+ (83'3 %)
Cultivo 7 <sup>o</sup> día	-	-	-
Cultivo 15 <sup>o</sup> día	-	-	-

Tabla 15: Queratitis por *S. pneumoniae* ATCC 6303. Grupo Profilaxis. Resultados microbiológicos.

TRATAMIENTO	PLACEBO	TOBRAMICINA	TIAMFENICOL
Cultivo 3 <sup>er</sup> día	+ (16'6 %)	+ (16'6%)	+ (33'3 %)
Cultivo 7 <sup>o</sup> día	+ (16'6 %)	-	-
Cultivo 15 <sup>o</sup> día	+ (16'6 %)	-	-

Tabla 16: Queratitis por *S. pneumoniae* ATCC 6303. Grupo Tratamiento. Resultados microbiológicos.

**2.2.3.- Resultados del número de bacterias viables presentes en la córnea extraída**  
(Tablas 17 y 18)

**2.2.3.1.- Grupo placebo**

Profilaxis: se identificó *Staphylococcus spp.* en el examen de una pieza corneal al final del estudio. No se encontró *S. pneumoniae* en ningún caso.

Tratamiento: el estudio de las piezas corneales es negativo en todos los casos .

**2.2.3.2.- Grupo tobramicina**

Profilaxis: el estudio de las piezas corneales reveló dos córneas en las que aparecían de 1 a 8 UFC/ml. correspondientes a *S. pneumoniae*.

Tratamiento: se aísla *Staphylococcus spp.* en el examen de una pieza corneal. En ninguna de ellas se identifica *S. pneumoniae*.

**2.2.3.3.- Grupo tiamfenicol**

Profilaxis: en el estudio de las piezas corneales encontramos dos córneas en las que aparecían más de 20 UFC/ml. correspondientes a *S. pneumoniae*.

Tratamiento: la valoración de las piezas corneales es negativa en todos los casos.

PROFILAXIS	PLACEBO	TOBRAMICINA	TIAMFENICOL
Córnea 1	-	-	+++
Córnea 2	-	+	+++
Córnea 3	-	+	-
Córnea 4	-	-	-
Córnea 5	†	-	-
Córnea 6	-	-	-

Tabla 17: Queratitis por *S. Pneumoniae* ATCC 6303. Grupo Profilaxis. Resultados del n° de bacterias viables encontradas en la córnea extraída.

TRATAMIENTO	PLACEBO	TOBRAMICINA	TIAMFENICOL
Córnea 1	-	-	-
Córnea 2	-	-	-
Córnea 3	-	-	-
Córnea 4	-	-	-
Córnea 5	†	-	-
Córnea 6	*	-	-

Tabla 18: Queratitis por *S. Pneumoniae* ATCC 6303. Grupo Tratamiento. Resultados del n° de bacterias viables encontradas en la córnea extraída.

-	=	0 UFC/ml.
+	=	1 - 8 UFC/ml.
++	=	8 - 20 UFC/ml.
+++	=	> 20 UFC/ml.
†	=	corresponde a conejos que murieron antes de finalizar el estudio.
*	=	corresponde a córnea enviada para estudio anatomopatológico.

#### 2.2.4.- Resultados anatomopatológicos

El estudio anatomopatológico de uno de los ojos, correspondiente al grupo placebo, elegido al azar, reveló una importante destrucción estromal, abundante material inflamatorio en cámara anterior, destrucción de procesos ciliares y del iris, sinequias anteriores y posteriores y afectación del cristalino con producción de catarata. Estos hallazgos corroboraron la impresión clínica estimada, de que estos ojos estaban abocados a la *ptisis bulbi*.

## **V.- DISCUSIÓN**

El estudio *in vitro* de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos ha ido tomando cada vez mayor interés debido al gran número de medicamentos antibacterianos en uso y al progresivo aumento de infecciones producidas por mutantes bacterianas resistentes.

Generalmente los tratamientos antibióticos en la clínica se basan en los resultados obtenidos de los antibiogramas y en determinaciones de la CMI, realizándose los protocolos de dosificación de los antimicrobianos empíricamente, de forma que alcancen en suero como mínimo, y en un tiempo breve concentraciones iguales a 4-5 CMI frente a los microorganismos patógenos, prescribiéndose el antibiótico en intervalos de tiempo de forma que la nueva dosis se alcance en sangre cuando aún exista al menos 1 CMI residual de la dosis anterior<sup>280</sup>.

El dato que se obtiene del antibiograma no tiene en cuenta la dinámica del crecimiento bacteriano. La CMI no considera el grado de penetración de los fármacos en los tejidos oculares, el pH del lugar de infección, el grado de unión a proteínas resultado de la presencia de escombros celulares, el contenido iónico del área infectada o el metabolismo del fármaco, todo lo cual afecta a las propiedades antibióticas de muchos antimicrobianos<sup>167</sup>.

Los parámetros farmacodinámicos tales como la tasa de actividad bactericida con incrementos en la concentración de los fármacos y el EPA, nos dan una descripción más precisa de la duración de la actividad antimicrobiana que sólo la CMI y nos permiten tener una información mayor de la acción de los antibióticos de cara a poder establecer una base más racional para la determinación de las dosis óptimas de los regímenes de tratamiento<sup>4, 5</sup>.

Sin embargo, la concentración que los antibióticos alcanzan en el interior del globo ocular es muy pequeña en relación con las concentraciones en suero, y considerando que es en la córnea donde hemos de alcanzar las concentraciones mínimas de 4-5 veces la CMI, hemos de tener en cuenta la escasa efectividad de muchos antibióticos utilizados por vía sistémica, ya que su concentración intraocular, en muchas ocasiones, está por debajo de la

---

CMI del germen causal de la infección<sup>58, 281</sup>.

Los estudios experimentales en animales y los ensayos clínicos en humanos, indican que la aplicación tópica es la mejor vía en el tratamiento de la infección corneal bacteriana, aunque las inyecciones subconjuntivales pueden ser beneficiosas en casos puntuales. Hay poco papel para la vía sistémica en el tratamiento de la infección corneal, excepto quizá en circunstancias inusuales<sup>167, 168, 249, 257, 264, 282, 283</sup>.

## 1.- EVALUACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL

### 1.1.- ELECCIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS

Son numerosas las publicaciones que hacen referencia a la implicación de estos microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus pneumoniae* como principales bacterias patógenas en infecciones agudas del segmento anterior del ojo, siendo aislados con menor frecuencia otros organismos coliformes como *Escherichia coli* y *Proteus vulgaris*<sup>53, 115, 146, 284-288</sup>.

Por otro lado, junto al aumento de protagonismo de ciertas bacterias consideradas hasta ahora de bajo poder patógeno, como es el caso del *S. epidermidis*<sup>48, 289, 290</sup> al cual se atribuyen lesiones corneales de gravedad variable en estudios experimentales en conejos y al incremento de su patogenicidad en úlceras corneales, infecciones postoperatorias y blefaroconjuntivitis<sup>291-293</sup>, y frente al cual se están encontrando tasas de resistencia comparativamente más altas que para el *S. aureus*, nos encontramos con queratitis tremendamente graves como las originadas por *P. aeruginosa* y otros patógenos corneales gram negativos<sup>44, 294, 295</sup> y que debido a su extendida distribución y a la resistencia opuesta a la mayoría de los antibióticos, a menudo se vuelven dominantes cuando se han eliminado las bacterias más sensibles.

Y es por ello, debido a su frecuencia en queratitis y a su prevalencia en ojos, por lo que han sido los microorganismos sobre los cuales se han desarrollado los mayores modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* de infección corneal<sup>167, 256, 257, 281, 296-298</sup> y que nos va a permitir la posibilidad de contrastar nuestros resultados.

La selección de cepas ATCC se hizo por homologar los resultados con los obtenidos por otros autores y después de haber ensayado con aislados clínicos oculares de las mismas especies sin encontrar diferencias significativas en los resultados.

## 1.2.- ELECCIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS

Hasta ahora gentamicina y cloranfenicol se han estado utilizando en el tratamiento de los procesos infecciosos de los ojos, y aunque gentamicina se considera de elección ante la sospecha de queratitis por bacilos gram negativos<sup>24, 299</sup>, Mahajan ya en 1983 informa un aumento en su resistencia del 84% y hasta de un 70% para el cloranfenicol en cultivos de infecciones postoperatorias<sup>284</sup>.

El amplio espectro de actividad de tobramicina ha probado su utilidad en el control de las infecciones oculares superficiales y profundas de los anejos oculares. Efectiva frente a los *Staphylococcus*, su uso se reserva para infecciones debidas a organismos gram negativos<sup>300-302</sup> habiéndose mostrado especialmente útil en el control de queratitis por *Pseudomonas* resistentes a gentamicina. Sin embargo, en los años 84-86 varios autores<sup>303, 304</sup> describen un surgimiento preocupante de bacterias resistentes a tobramicina, así como falta de un control adecuado de las infecciones debidas a organismos gram positivos (especialmente algunas cepas de *S. pneumoniae* y *Streptococcus* del grupo D) y gram negativos (*Neisseria* y *Bacteroides*).

Escogimos ofloxacino por ser un antimicrobiano perteneciente a una familia de quimioterápicos cuyo uso en el campo de las infecciones oculares aún no se ha

generalizado.

Tiamfenicol se eligió por su actividad frente a *Streptococcus pneumoniae* superponible a la de cloranfenicol, pero con una tasa comparativa de toxicidad a nivel medular menor y tampoco comercializado aún en este campo.

Y se comparó su actividad con la de otros antimicrobianos de uso más difundido como rifampicina, gentamicina y tobramicina cuya eficacia ha sido ampliamente demostrada en las infecciones oculares externas<sup>146, 158, 247</sup>.

### 1.3.- MODELO *IN VITRO*: EVALUACIÓN DEL EPA

#### 1.3.1.- Justificación del método

El método para eliminar el antimicrobiano del medio una vez que ha terminado el tiempo de exposición puede tener una gran incidencia sobre los resultados<sup>209</sup>.

La técnica más empleada es la de **centrifugación y lavados repetidos**, la cual se realiza sometiendo a los caldos de cultivo a centrifugación a 1200 g durante 5-10 minutos, retirando el sobrenadante y resuspendiendo el *pellet* de las bacterias en medio fresco libre de fármaco<sup>182, 214, 218, 219, 221, 227-229</sup>. Todos los investigadores han usado al menos dos lavados para asegurar la eliminación total de los antimicrobianos. Con eliminación del 90% del sobrenadante, dos lavados reducen la concentración de antibiótico unas 100 veces<sup>182, 218, 219</sup>. Con decantación completa del sobrenadante, dos lavados pueden reducir las concentraciones cerca de 10.000 veces<sup>221</sup>.

El lavado *per se* es aplicable a todos los antimicrobianos, pero su procedimiento requiere al menos 30 minutos y además, puede causar una reducción temporal en la tasa de crecimiento bacteriano<sup>174</sup>, y ello se ha atribuido a diferentes factores como son la

disminución de la temperatura durante la centrifugación, los efectos mecánicos y osmóticos de la centrifugación sobre las bacterias y la disminución en el acceso de las bacterias a los nutrientes del medio pudiéndose romper la adherencia con lo que el antimicrobiano se eliminaría más fácilmente de la bacteria disminuyendo su efecto. Pero aunque todo ello sucede de forma similar en los cultivos control no tratados, hemos de tener presente que las bacterias tratadas son más frágiles y por tanto, mucho más sensibles a los deterioros mecánicos, y esto se ha visto especialmente en organismos gram negativos, y más concretamente en *P. aeruginosa*<sup>181</sup>.

Un método más rápido y simple para eliminar el antibiótico -casi exclusivo de los antibióticos betalactámicos- es la **inactivación química** del mismo. La adición de betalactamasa a los cultivos expuestos inactiva rápidamente a penicilinas y cefalosporinas<sup>175, 178, 188, 189, 217, 236, 240, 246</sup>. Sin embargo, otras clases de antimicrobianos no pueden ser tan fácilmente inactivados. Así, el polvo de celulosa-fosfato que se une e inactiva a los aminoglucósidos, requiere un paso de centrifugación para separarlo de los microorganismos<sup>201</sup>.

La **dilución** como método simple para la eliminación rápida del antimicrobiano consiste en añadir un pequeño volumen del cultivo expuesto al antibiótico a un gran volumen de medio fresco libre del mismo<sup>182, 198, 252</sup>. El grado de la dilución debe ser lo suficientemente alto para que la concentración del antibiótico en el cultivo diluido no logre afectar al crecimiento normal de los organismos control. Con concentraciones cercanas a la CMI, una dilución de  $10^{-2}$  es suficiente. Concentraciones más altas requieren diluciones de  $10^{-3}$  ó  $10^{-4}$ <sup>182</sup>. Se necesitan inóculos de salida altos, al menos de  $10^5$ - $10^6$  UFC/ml ya que los organismos se diluyen en la misma extensión que el antimicrobiano.

Este método puede aplicarse a todos los antimicrobianos, pero debe tenerse especial cuidado cuando se utilice con antibióticos con acción bactericida rápida, ya que la dilución puede reducir el número de microorganismos por debajo del rango detectable de forma más fácil que el lavado repetido<sup>181</sup>.

La técnica de la **membrana de agar de Lorian** implica la exposición de los microorganismos sobre un filtro de membrana al antimicrobiano difundiendo a la superficie del agar. El fármaco se elimina por transferencia repetida desde los filtros a las placas de agar libres de antibiótico y al igual que con la dilución, el EPA obtenido es siempre mayor, ya que parte del antimicrobiano puede quedar en el medio o adherido a las bacterias, no siendo eliminado por completo<sup>4, 305</sup>.

La ventaja potencial de este método que puede aplicarse a todos los antimicrobianos es que los organismos se ven menos afectados por la presión osmótica y otros efectos mecánicos de los medios líquidos. Sin embargo, es técnicamente más complicado que la dilución o la inactivación química y consume más tiempo que el modelo en medio líquido<sup>181, 306</sup>.

Por todo lo expuesto y con la experiencia recogida de los trabajos de Bundtzen y Craig<sup>181, 182</sup>, que concluyen en no variación en los tiempos de EPA en más de un 30% utilizando los 3 primeros métodos aquí comentados sobre diversos microorganismos (*S. pneumoniae* y *S. aureus* entre otros), escogimos la dilución en medio fresco como método para la eliminación del antimicrobiano por adecuarse a nuestras posibilidades de trabajo al ser:

- 1) rápida,
- 2) sencilla y de fácil realización,
- 3) no producir alteraciones fisiológicas celulares,
- 4) comparable con los resultados obtenidos por otros autores<sup>4, 181, 307, 308</sup>, y
- 5) aplicable a todas las combinaciones de antimicrobiano/microorganismo.

### **1.3.2.- Cuantificación del EPA**

La fiabilidad del EPA está determinada por la técnica utilizada para cuantificar la cinética de crecimiento microbiológico tras la eliminación del fármaco. Las variaciones en

---

el EPA entre los diferentes métodos podrían estar relacionadas con la sensibilidad y la reproductibilidad del procedimiento a la hora de cuantificar exactamente dicho crecimiento.

Generalmente todos los métodos se contrastan con la **técnica de recuento de células viables** descrita por Bundtzen<sup>182</sup> que es la más utilizada para medir el EPA. No obstante este método tiene dos inconvenientes que pueden inducir a error: las diluciones seriadas y el hecho de asumir que una colonia representa a una sola bacteria.

Los primeros investigadores cuantificaron el EPA por estimación del período de tiempo del crecimiento estacionario<sup>175, 177, 242</sup>. Sin embargo, las curvas de crecimiento tras la eliminación del fármaco no reflejan siempre un período llano estacionario seguido de un crecimiento logarítmico agudo. A menudo, se observa un incremento gradual en el recuento viable hasta que se alcanza un crecimiento normal. Otras veces, puede encontrarse una disminución en el número de organismos antes de que el crecimiento se haga estacionario. Algunas de estas diferencias pueden simplemente reflejar errores o variación en la dilución, en la realización del recuento. Sin embargo, Wilson y Rolinson<sup>180</sup> demostraron que células bacterianas individuales en el interior del cultivo podían presentar un período variable de supresión en el crecimiento. Observaciones con *S. aureus* con microscopio de contraste de fase encontraron que la inhibición del crecimiento de una bacteria individual variaba de 20 minutos a 3 horas tras inactivación con penicilasa. Así el modelo de crecimiento para el cultivo entero, aparentemente representaría el efecto medio sobre los organismos individuales.

Por otro lado, se han atribuido posibles subestimaciones en el EPA al asumir que hay una correspondencia entre una bacteria y una UFC. Los organismos gram negativos tienden a filamentarse después de exponerse a los antibióticos betalactámicos con lo que se tomaría un filamento (de 2 a 20 células) como una UFC. Cuando las bacterias tratadas se pasan a un medio sin antibiótico en la hora cero del experimento, los filamentos se dividen en células independientes y estaríamos ante un error porque iniciamos el recuento a partir de un número inferior al que existe y, con el tiempo, se crearía un crecimiento virtual

---

rápido en los cultivos pretratados en relación con el control, justamente por la división del filamento, lo que daría un falso EPA negativo. Esto podría justificar que sólo se obtenga EPA en bacilos gram negativos cuando trabajamos a concentraciones muy altas de betalactámicos<sup>181, 184</sup>.

Por otra parte, con organismos gram positivos en el recuento en placa puede estimarse un menor efecto letal, debido a que los cocos tratados pueden adherirse unos a otros con mayor facilidad que los no tratados y de esta manera, en la curva de letalidad la cuantificación del número de UFC disminuiría tanto por la acción bactericida del antimicrobiano como por el aumento en su agregación y partiríamos igualmente de un número inferior de UFC en el tiempo cero del EPA. Del mismo modo, puede ser que los organismos sean viables pero incapaces de formar colonias en medio sólido, con lo que también estaríamos midiendo menos bacterias viables de las que en realidad hay<sup>309</sup>.

Para evitar estos problemas y proporcionar un método estandarizado que permitiera comparar las diferentes metodologías y los experimentos similares realizados en distintos días, Bundtzen<sup>182</sup> desarrolló la ecuación descrita en el apartado de materiales y métodos para cuantificar el EPA. La razón para elegir un incremento de 1 logaritmo de base 10 en las UFC/ml es que más allá de este nivel, la tasa de crecimiento de los organismos previamente expuestos es idéntica a la de los controles no tratados<sup>8</sup>. Así que lo que realmente medimos es el tiempo para alcanzar un crecimiento logarítmico normal.

A pesar de estos inconvenientes, el recuento de UFC es valioso por su relativa facilidad, rapidez, economía y uso extendido, lo que permite comparar resultados<sup>181</sup>. Además, este mismo método de cuantificación se ha usado para la técnica de filtro de membrana y, con él, los estudios comparando métodos de eliminación rápida del antibiótico han dado de forma consistente EPA que no varían en más de un 30%<sup>181, 182</sup>.

También se han usado otros métodos de recuento para medir la cinética de crecimiento microbiológico y cuantificar el EPA.

Utilizando la **densidad óptica con espectrofotómetro** se cuantifica el EPA como la diferencia en el tiempo que tarda en reducir un 5% la transmisión de la luz entre los cultivos expuestos al antimicrobiano y los cultivos control. Shah y cols.<sup>204</sup> en 1978, midieron con este método el EPA de penicilina sobre bacterias gram positivas y gram negativas después de la adición de penicilasa, aunque, no compararon sus resultados con recuentos. Posteriormente, Bergan y cols.<sup>211</sup> no encontraron diferencias entre los resultados obtenidos usando densidad óptica y recuento de UFC para cloranfenicol y tetraciclina frente a *E. coli* y para oxitetraciclina y flucloxacilina frente a *S. aureus*.

Tampoco Rescott<sup>203</sup> en 1988, y Meng<sup>310</sup> en 1991 encontraron variaciones significativas en el valor del EPA así medido y el de recuento de UFC para *E. coli* expuesta a ampicilina, tobramicina, rifampicina y ciprofloxacino.

Sin embargo, con betalactámicos y aminoglucósidos sobre bacilos gram negativos se han observado discrepancias significativas obteniendo con técnicas ópticas valores de EPA mucho más largos que con el recuento de UFC<sup>184</sup>, y ello se ha atribuido a una aparente reducción de la transmisión óptica producida por los filamentos<sup>309</sup>, lo cual también ha sido informado por Craig y Gudmundsson<sup>181</sup>.

Este método, que tiene la ventaja de poder realizar varios ensayos en el mismo día, ya que precisa poco tiempo y material en su realización y cuyo resultado se puede leer en el mismo día, tiene la limitación de que es incapaz de medir concentraciones por debajo de  $10^4$ - $10^6$  UFC/ml lo cual podría originar sobrestimación de los resultados debidos a un aparente letargo en el crecimiento.

El método de **cambios en la morfología** descrito por Lorian<sup>199</sup> determina el EPA a partir de la observación directa de la alteración de la morfología bacteriana producida por los antimicrobianos, así como en la variación de la actividad enzimática. Las alteraciones morfológicas no son uniformes en cada organismo, pero se correlacionan bien con la duración del EPA determinado por recuento. Su uso queda relegado a aquellos

antimicrobianos capaces de producir una alteración en la morfología bacteriana y así se ha observado engrosamiento de la pared celular en la combinación rifampicina/*S. aureus*, cambios mínimos con gentamicina/*S. aureus* y agregados electrodensos intracelulares con tobramicina/*P. aeruginosa*<sup>311</sup>. Con betalactámicos la correlación ha sido menor, habiéndose encontrado EPA más prolongados que con el recuento en placa<sup>184</sup>.

En el método de los **cambios en la conductancia eléctrica del medio de cultivo**<sup>5, 184</sup>, descrito por Gould<sup>205</sup> y Baquero<sup>193</sup>, el analizador del crecimiento bacteriano mide el retraso en la iniciación del crecimiento exponencial de la población por el tiempo de generación del microorganismo. Este método disminuye el tiempo de experimentación, pero necesita todo un equipo de precisión y además no es capaz de detectar crecimientos bacterianos por debajo de  $10^{4.5}$  UFC/ml y aunque existe una buena correlación con el método de recuentos viables, el EPA cuantificado es ligeramente mayor.

El método de la **bioluminiscencia del ATP intracelular**<sup>200-202</sup> asume que el contenido de ATP en las bacterias es relativamente constante, estableciéndose una correlación entre viabilidad celular y ATP intracelular. Es un método rápido, sensible y muy útil para determinar y cuantificar el EPA en los antimicrobianos que producen una elevada mortalidad.

La correlación de esta técnica con el recuento es en cierto modo controvertida en la literatura, autores como Hanberger<sup>312, 313</sup> encuentran buena correlación de este método con el recuento y la densidad óptica para daptomicina y vancomicina frente a gram positivos, sin embargo, para gram negativos expuestos a betalactámicos observan un EPA negativo en contraste con el método de recuento<sup>314, 315</sup>.

La mayoría de los autores obtienen EPA mayores que con el recuento de UFC. Odenholt<sup>316</sup>, ensayando con imipenem frente a *P. aeruginosa*, obtiene EPA de 3 a 5 h con bioluminiscencia del ATP y de 1 a 2 h con el recuento. También Mattie<sup>200</sup> con ampicilina frente a *E. coli* obtiene mayor EPA con este método, mostrando el recuento un

recrecimiento casi inmediato al añadir la penicilasa, el contenido de ATP queda suprimido por varias horas<sup>181</sup>. Estas diferencias pueden deberse a la posibilidad de que el ATP de algunas células muertas no lisadas sea estimado como ATP de células supervivientes, lo que resultaría en una falsa elevación del ATP.

Una técnica adicional es la medición de la radioactividad que produce la **adición de <sup>3</sup>H-timidina** a las proteínas y ADN de las bacterias viables mediante un contador de centelleo. Gottfredsson y cols.<sup>207, 208</sup> observaron que la exposición de *S. aureus* durante 1 hora a CMI y 16 CMI de ciprofloxacino incrementaba la tasa de síntesis de ADN por organismo de forma progresiva hasta un valor de 1'5 horas tras quitar el antimicrobiano. La máxima incorporación de <sup>3</sup>H-timidina se relacionó directamente con la duración del EPA. La importancia fisiológica del incremento de la síntesis de ADN se desconoce, pero el incremento de la actividad metabólica coincidente con un incremento en la duración del EPA sugiere un mecanismo común.

La ventaja de esta técnica sobre la anterior es que las bacterias muertas no lisadas no pueden incorporar timidina tritiada y ello permite medir el EPA de manera muy acorde con los valores obtenidos en el recuento de UFC, pero su uso no parece rentable.

En la medición por **espectrofotometría del CO<sub>2</sub>** producido en el medio de cultivo en los procesos de fermentación bacteriana en los viales de crecimiento descrita por Gottfredsson<sup>206</sup>, los valores del EPA medidos son muy similares a los obtenidos con método de recuento de células viables. Es una técnica muy sensible y reduce el tiempo de experimentación a 3 horas, pero requiere un material que no está disponible en muchos laboratorios.

Realmente lo que interesa es conocer si existe un cambio en la cinética de crecimiento de las bacterias tratadas respecto del control y si ese cambio está dentro de un rango significativo para modificar la dosificación<sup>310</sup>. Y estos estudios sugieren que el recuento, que es un método aplicable a todas las combinaciones de

---

antibiótico/microorganismo y que es fácilmente asequible a cualquier laboratorio por su bajo coste y realización, es también un método seguro para la medición de las cinéticas de crecimiento, como lo demuestra su amplia utilización.

### 1.3.3.- Influencia de la concentración de antimicrobiano

La mayoría de los autores<sup>8, 180, 182, 204 242</sup> sólo encuentran EPA cuando ensayan a **concentraciones mayores ó iguales a la CMI**, y observan que incrementos en la concentración prolongan el EPA a un punto de máxima respuesta por encima del cual no se observa un aumento significativo del EPA, que para la mayoría de las combinaciones de antibiótico/microorganismo que realmente tienen EPA, se halla a 6-10 CMI<sup>180, 181</sup>.

Zhanel y cols.<sup>317</sup> han sugerido utilizar **concentraciones subCMI**, ya que los antibióticos que son bactericidas a concentraciones iguales o un poco por encima de la CMI (betalactámicos, aminoglucósidos y quinolonas) eliminarán una gran parte de las bacterias cuando se expongan a la acción del antimicrobiano y, en estos casos, el EPA podría representar la recuperación de los miembros de la población bacteriana más resistentes.

Eagle<sup>242</sup> fue el primer investigador que examinó el efecto de la concentración del antimicrobiano sobre el EPA. Sus estudios con penicilina G sobre cocos gram positivos demostraron que la duración del EPA aumentaba con incrementos de las concentraciones hasta un tiempo de máximo EPA a la concentración de penicilina más rápidamente bactericida para el microorganismo, e incrementos en la concentración -incluso 10.000- sobre ese nivel no prolongaban significativamente la duración del EPA. Wilson y Rolinson<sup>180</sup> tampoco encontraron prolongación del EPA de penicilina G y ampicilina sobre *S. aureus* expuesto a concentraciones de 10 a 100 CMI.

Posteriormente, Craig y Gudmundsson<sup>181</sup> con eritromicina, penicilina G y trimetoprim encontraron una progresiva prolongación del EPA de una cepa estándar de

---

*S. aureus*, hasta un punto de máximo EPA a concentraciones de 6 a 10 CMI. Sin embargo, no observaron una duración máxima del EPA con rifampicina incluso a concentraciones mayores a 200 CMI.

En cuanto a los bacilos gram negativos, se han encontrado comportamientos diferentes en dependencia de la clase de antibiótico. Así, Craig y Gudmundsson<sup>224</sup>, con inhibidores de la síntesis de proteínas y del ARN, observaron EPA de 1'2 a 4'2 horas con 1 hora de exposición a 4 CMI, sobre cepas estándar de *E. coli* y *P. aeruginosa*. Sin embargo, fue necesario prolongar la exposición y aumentar las concentraciones hasta 8-16 CMI para inducir EPA cortos con trimetoprim, ampicilina y cefamandol; e igual ocurrió con cloranfenicol, rifampicina y tetraciclina<sup>4</sup>. Con tobramicina no se pudo determinar un efecto máximo debido a la rápida y completa mortalidad de los microorganismos a altas concentraciones<sup>181</sup>.

También los antibióticos betalactámicos son capaces de producir un EPA con bacilos gram negativos, pero solamente a concentraciones altas<sup>4, 187, 219, 318</sup>. Así, se necesitan concentraciones de 10 CMI de ampicilina para producir EPA significativo con *H. influenzae*. Con fluorquinolonas, Fursted<sup>319</sup> demostró que el EPA de ciprofloxacino sobre *P. aeruginosa* aumentaba al incrementarse la concentración de antimicrobiano hasta 10 CMI, a partir de la cual ya no se producía un aumento en la duración del EPA.

En general, deberían escogerse aquellas concentraciones que se alcanzan realmente en suero, tejidos o líquidos orgánicos después de una dosis habitual de antibiótico, y así aproximar más fácilmente los resultados *in vitro* a la situación *in vivo*. Nosotros elegimos concentraciones iguales a la CMI y 10 CMI con la idea de identificar la existencia de EPA significativo a CMI y si éste era máximo a 10 CMI, así como elaborar una escala de actividad comparada sobre organismos gram positivos y gram negativos con los antibióticos elegidos.

#### 1.3.4.- El tiempo de exposición del microorganismo al antibiótico

Entre los efectos de la duración de la exposición sobre organismos gram positivos, Eagle y cols.<sup>177, 178</sup> observaron un EPA máximo de penicilina G sobre cocos después de 2-4 horas de exposición; sin embargo, algunas cepas mostraron incrementos del EPA después de 24 horas de exposición. También con ampicilina y eritromicina se ha descrito EPA más largo al incrementar la duración de la exposición por encima de 4 horas sobre *S. pneumoniae* y *S.aureus*<sup>309</sup>.

Los estudios sobre los efectos de la duración de la exposición sobre el EPA con bacilos gram-negativos son mucho más limitados. Craig y Gudmundsson<sup>224</sup>, con 1 hora de exposición a concentraciones 4 CMI con inhibidores de la síntesis de proteínas y de ARN observaron EPA de 1'2 a 4'2 horas sobre cepas estándar de *E. coli* y *P. aeruginosa*. Con ciprofloxacino, Fuursted y cols.<sup>319</sup> observaron una prolongación del EPA sobre *Pseudomonas aeruginosa* al aumentar el tiempo de exposición hasta un máximo de 1 a 2 horas de contacto. A partir de ese tiempo, ya no se incrementaba el EPA, aunque se prolongase la exposición.

Con betalactámicos (ampicilina y cefamandol), trimetoprim, cloranfenicol, tetraciclinas y rifampicina se ha visto que incrementos en los tiempos de exposición junto a concentraciones de antibiótico más elevadas (8-16 veces la CMI) pueden inducir EPA sobre bacilos gram negativos. Y así, con ampicilina y otros betalactámicos sobre *E. coli*, Shah y cols.<sup>204, 320, 321</sup> han observado una prolongación progresiva del EPA de 0'5 a 8 horas al aumentar los tiempos de exposición de 0'5 a 3 horas.

Por otro lado, Craig y Gudmundsson<sup>181</sup> estudiaron el efecto de la duración de la exposición de rifampicina sobre *E. coli* con 4 concentraciones diferentes y obtuvieron una serie de curvas relativamente paralelas que les llevó a decir que la duración de la exposición y la concentración tienen igual efecto sobre el EPA y que doblando la concentración se obtiene aproximadamente el mismo efecto que doblando la duración de la exposición.

En general, la mayoría de los estudios se hacen con tiempos de exposición que oscilan entre 0'5 y 2 horas, pero todos los autores coinciden en que una prolongación del tiempo de exposición del microorganismo al antimicrobiano produce un aumento en la duración del EPA<sup>4, 8, 173, 182, 187, 204, 209, 242</sup>. Y al igual que ocurre con la concentración, el EPA aumenta con el tiempo de exposición al antibiótico hasta un punto de máxima respuesta, a partir del cual ya no se produce un mayor aumento del mismo.

Sin embargo, un EPA máximo es difícil de determinar con algunos antimicrobianos que por su rápida acción bactericida -más a concentraciones elevadas o con exposiciones largas- nos originarían una disminución significativa del inóculo con la consiguiente sobreestimación del EPA. Así, en nuestro caso, un tiempo de exposición de 1 hora fue excesivo para la combinación de *S. epidermidis* a 10 CMI de gentamicina y tobramicina e incluso a 5 CMI de tobramicina, lo cual nos llevó -atendiendo a la experiencia de otros autores<sup>181</sup>- a reducir a la mitad la concentración del antibiótico en algunos casos.

### **1.3.5.- Influencia de la concentración del inóculo**

Una de las variables más importantes en el estudio de la actividad de un antibiótico es la concentración del inóculo, que para la CMI/CMB se trata de estandarizar en  $10^5$  UFC/ml<sup>277, 321</sup>. Sin embargo, este apunte de estandarización es inexistente en el EPA, y así, el rango del inóculo varía según los autores<sup>181, 182, 193-195, 225</sup>.

La influencia de la concentración del inóculo en la actividad bactericida de un antimicrobiano va a depender por un lado del antibiótico (características físico-químicas, mecanismo de acción, farmacocinética, etc.) y por otro de la bacteria a la que se enfrenta (tipo y cepa, fase de crecimiento y tiempo de generación de la misma).

Por efecto inóculo entendemos la existencia de una cooperación bacteriana que con frecuencia limita la acción del antibiótico. De esta manera, la actividad letal de un

antimicrobiano es inversamente proporcional a la densidad de la población bacteriana. Se ha descrito con penicilinas, cefalosporinas de 1ª, 2ª y 3ª generación, imipenem y monobactam para bacilos gram negativos -especialmente *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas*- y para *S. aureus*<sup>322-324</sup>, y es posible que tenga trascendencia *in vivo*, incluso con mayor frecuencia de lo que hasta ahora se conoce.

No se sabe muy bien su porqué, en el caso de los betalactámicos que pueden ser inactivados por la producción de betalactamasas bacterianas, un aumento del inóculo puede llegar a anular el EPA debido a la neutralización del antimicrobiano por las enzimas. Otros autores<sup>309, 325</sup> señalan la existencia de una variante resistente ocasional que emergería de un inóculo grande al suprimirse la población sensible con el antibiótico<sup>326</sup>. Por último, otra explicación que se ha sugerido ha sido la existencia de sustancias inhibitoras en el medio, que no interfieren en las pruebas de sensibilidad, pero que pueden neutralizar al antimicrobiano como las sulfamidas cuando un inóculo alto aporta concentraciones importantes de inhibidores como el ácido paraaminobenzoico (PABA)<sup>327</sup>.

Varios autores como McDonald y cols.<sup>8</sup> y Eagle y Musselman<sup>242</sup> han encontrado una disminución ligera del EPA de *S. aureus* frente a penicilina G y eritromicina asociado a un incremento en el inóculo. En los ensayos con *Enterobacteriaceae* utilizando imipenem se han observado reducciones importantes del EPA con inóculos de 10<sup>7</sup> UFC/ml frente a los obtenidos con 10<sup>5</sup> UFC/ml<sup>328</sup> y sobre *P. aeruginosa* con inóculos de 10<sup>8</sup> se ha encontrado disminución de la acción bactericida y anulación del EPA que es recuperable con la aireación de los cultivos, lo cual parece indicar que se produce dificultad en la penetración del antimicrobiano en los sitios diana, como consecuencia de una baja tensión de oxígeno<sup>329</sup>.

En cuanto a los inhibidores de la DNA-girasa bacteriana, en algunos trabajos con ofloxacino y ciprofloxacino se han observado modificaciones de la CMI de *S. aureus* y *E. coli* en un pequeño grado por el efecto de un inóculo elevado, siendo estos valores de la CMI directamente proporcionales al tamaño del inóculo. Parece ser que este hecho es

---

común para algunas fluorquinolonas, sobre todo si se las compara con el ac. nalidíxico. Y así, algunos autores<sup>71, 76, 330</sup> han encontrado un leve efecto inóculo con ofloxacino. Y ello podría explicarse por la disminución de la tensión parcial de oxígeno, que originaría una acción bacteriostática de las 4-quinolonas<sup>63, 331</sup>.

Nosotros hemos utilizado inóculos de  $10^6$ - $10^7$  UFC/ml por ser estas concentraciones las máximas alcanzadas en la córnea tras la inoculación de bacterias en los modelos *in vivo* en animales de experimentación que simulan la infección en humanos<sup>167, 256, 257, 296-298</sup> y también para evitar que dada la actividad bactericida de los aminoglucósidos y quinolonas sobre todo a altas concentraciones nos quedásemos sin inóculo de partida tras la eliminación por dilución del antimicrobiano y no poder así validar la existencia del EPA.

### **1.3.6.- Fase de crecimiento de los microorganismos**

Los estudios experimentales de UC señalan que tras la inoculación de las bacterias en el estroma corneal del animal, éstas alcanzan un crecimiento logarítmico que coincide con el tiempo en que se desarrolla la infección corneal, seguido de una fase de crecimiento estacionario y posterior declive del mismo a partir de las 24-72 horas<sup>68, 256, 257, 296-298</sup>.

La mayoría de los estudios de EPA se han realizado con organismos en fase de crecimiento logarítmico y ello nos va a permitir en nuestro caso, la valoración de la actividad del antibiótico en un momento de multiplicación bacteriana durante un período de tiempo corto (6-8 horas), que se corresponde en la mayor parte de los estudios experimentales con el tiempo de generación de la infección corneal. Por otro lado, el que la mayoría de los estudios se hayan realizado en esta fase de crecimiento bacteriano permite establecer comparaciones entre los resultados.

Sin embargo, existe controversia en los tiempos de EPA según que se realicen en

una u otra fase de crecimiento bacteriano, y así, mientras Craig y Gudmundsson<sup>224</sup> con penicilina G/*S. aureus* y Gerber<sup>213</sup>, Kirby y Craig<sup>332</sup> con gentamicina/*P. aeruginosa* muestran duraciones similares del EPA independientes de la fase de crecimiento, Tuomanen<sup>333</sup> sí encuentra diferencias con otras combinaciones de antimicrobiano/microorganismo.

### 1.3.7.- **Agitación mecánica**

Hay estudios contradictorios acerca de si los cultivos estacionarios o en agitación presentan un EPA distinto<sup>237, 334</sup>. La mayoría de los investigadores no informan sobre la utilización de agitación mecánica de los cultivos durante la exposición al antimicrobiano. Craig y Gudmundsson<sup>181</sup> realizan sus estudios con agitación continua. Wilson y Rolinson<sup>180</sup> no encontraron diferencias significativas en la duración del EPA de penicilina G sobre *S. aureus* bajo condiciones estacionarias o en un baño de agitación continua. Sin embargo, Lee y cols.<sup>335</sup> observaron que la agitación mecánica acortaba el EPA de ampicilina frente a *E. coli*, y así, de un EPA de 1'4 horas en fase estacionaria se pasaba a 0'6 horas, incluso EPA negativo, con la agitación continua.

Nuestros ensayos se hicieron en agitación continua, pero creemos que deberían realizarse estudios más extensos sobre este aspecto del EPA.

### 1.3.8.- **Influencia del medio de cultivo**

Los medios de cultivo constituyen un factor importante en la presencia y/o duración del EPA. Se han descrito diferentes tiempos de EPA según el caldo utilizado. Sin embargo, esta influencia ha sido poco estudiada. Así todos aquellos componentes que produzcan un cambio en el pH, en la concentración de cationes, sales minerales o proteínas afectarán a la actividad bactericida de los antimicrobianos y por tanto al EPA<sup>309</sup>.

Los cambios en la presión osmótica de los medios nutritivos van a condicionar que las bacterias tratadas sean más fácilmente lisadas en medios hiper/hipotónicos y ello puede alterar el EPA. Así, los esferoplastos que elaboran su pared antes de dividirse mueren si la presión osmótica es inadecuada y por tanto su EPA puede ser sobreestimado, mientras que las bacterias viables que tienen su pared intacta pueden dividirse antes y por tanto su EPA ser mas corto.

Varios estudios con betalactámicos han puesto de manifiesto que el EPA inducido sobre cepas de *S. aureus* es mayor cuando se utiliza caldo Trypticase Soy (TSB) como medio de cultivo que cuando se utiliza caldo Müller Hinton<sup>224, 320</sup>. Por otro lado, Wilson y Rolinson<sup>180</sup> no observaron diferencias en la duración del EPA de *S. aureus* expuesto a penicilina G en caldo de Müller-Hinton ó en Brain Heart Broth (BHB)<sup>192, 245</sup>.

Koch y Burchall<sup>336</sup> observaron que el trimetoprim sólo producía EPA si la concentración de timidina -que inhibe la acción del trimetoprim- en el medio de cultivo era baja. Y así con TSB rico en timidina se encontró poco EPA sobre *S. aureus* y sin embargo, con MHB se obtuvo un EPA de aproximadamente 2 horas. La eliminación del exceso de timidina por la adición de timidin fosforilasa al TSB originó un EPA de 2'4 horas y solamente produjo un ligero incremento del EPA a 2'2 horas en MHB.

Zhanel y cols.<sup>337</sup> describen la influencia del LCR como medio de cultivo en la prolongación del EPA y en un estudio con *E. coli* expuesto durante 2 horas a 2 CMI de cefotaxima, ciprofloxacino y gentamicina en MHB y LCR encontraron un aumento del EPA en LCR. Sin embargo, la reducción del crecimiento de las bacterias fue similar en ambos caldos.

También se ha visto que el **suero humano** añadido a los medios de cultivo influye en la duración del EPA<sup>173, 211</sup>. Así mientras que la lisozima favorece el efecto bactericida<sup>179</sup>, la unión de las proteínas a los antibióticos disminuye su acción y por tanto reduce el EPA. Bundtzen y cols.<sup>182</sup> observaron que el suero aumentaba la CMI de rifampicina y tetraciclina

sobre *E. coli* en la misma medida en que el EPA disminuía, y que cuando se comparaba con múltiplos similares de la CMI, la duración del EPA, en suero y en caldo, era superponible. Sobre fluorquinolonas, Davidson y Zhanel<sup>338</sup> han visto que el suero humano normal aumentaba el EPA sobre *S. aureus*, y también encontraron resultados similares con gentamicina y cefalexina; en cualquier caso, el suero aumentó la CMI de las fluorquinolonas.

Aunque cualquier caldo podría usarse para la mayoría de los organismos, Craig y Gudmundsson<sup>181</sup> recomiendan MHB y TSB para *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas*, y caldo de Scchaedler para *Streptococcus*. Nuestros estudios se hicieron con MHB por homogeneizar las condiciones de trabajo al ser el medio reconocido internacionalmente<sup>339</sup>, siendo suplementado con sangre desfibrinada de carnero al 5% para el manejo del *S. pneumoniae* debido a sus condiciones especiales de crecimiento.

### 1.3.9.- **Influencia del pH**

La actividad bactericida y el EPA de los antibióticos se encuentran estrechamente relacionadas y muchos de los factores que modifican o alteran la actividad antibacteriana modifican también la presencia y la duración del EPA. El pH es una de las variables que más influye en la actividad de los antimicrobianos y, como ya se ha visto en diversos trabajos, va a repercutir también en el EPA<sup>309</sup>.

Quizá el efecto del pH se deba a los distintos grados de ionización de los antimicrobianos en el medio ambiente celular, lo cual afectaría a su penetración y fijación en la célula bacteriana. Nosotros elegimos un pH fisiológico  $7.2 \pm 0.2$  para todos nuestros ensayos por la posibilidad de comparar con otros autores<sup>340</sup>.

Sin embargo, casi todos los estudios de EPA se realizan a pH fisiológico sin considerar que en la mayoría de los procesos infecciosos el pH es más ácido y que, por

ejemplo, ello reducirá la actividad bactericida de aminoglucósidos y fluorquinolonas<sup>209, 228, 235, 341, 342</sup>, aumentando los valores de sus CMI, mientras que los betalactámicos se ven menos afectados<sup>309</sup>. Con agentes antifúngicos y levaduras, Craig y Gudmundsson<sup>181</sup> encontraron EPA más largos a pH ácido (5'3) que a pH neutro (7).

Craig y Vogelmann<sup>5</sup>, con aminoglucósidos y quinolonas, observaron un efecto negativo sobre el EPA al utilizar pH ácido, y ello se atribuyó al cambio de la carga eléctrica neta en la molécula de estos antibióticos en condiciones de acidez, de modo que se modifica su penetración en la célula bacteriana por una bajada en el potencial eléctrico transmembranal<sup>343, 344</sup>, por lo que la CMI aumenta y el EPA se reduce. También Gudmundsson<sup>235</sup> observó un efecto supresor en la actividad de los aminoglucósidos y fluorquinolonas sobre *E. coli* y *P. aeruginosa*, con CMI más altas, disminución de la tasa bactericida y EPA más cortos.

Solo las 4-quinolonas que poseen un anillo de piperazina en el C7 del núcleo quinolónico, como ciprofloxacino, norfloxacino y ofloxacino tienden a estar protonadas a pH 5'5, mientras que las que no poseen este sustituyente tienden a ser neutrales y por tanto, no ven modificada su entrada a la célula ni, por tanto, su actuación. Y así el EPA de ciprofloxacino frente a *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus* no se altera al reducir el pH de 7'9 a 7'2 mientras que a pH 5'5 se hace nulo<sup>209, 235, 316</sup>. De la misma forma, el EPA de netilmicina sobre *S. aureus* y *E. coli* se reduce drásticamente de 6 horas en los pH alcalinos a 0'4 horas en el pH ácido<sup>238</sup>.

Por otro lado, Kumada<sup>345</sup> y Pérez Giraldo<sup>346</sup> observan un descenso en la actividad de ofloxacino sobre *E. coli* en MHB a pH 5'5, pero son de la opinión -junto a Reeves<sup>347</sup> y otros autores que han estudiado el efecto del pH sobre la actividad de las 4-quinolonas<sup>348, 349</sup>- de que este hecho, que es importante para concentraciones cercanas a la CMI, es poco significativo cuando se utilizan concentraciones elevadas en terapéutica.

#### 1.4.- MODELO *IN VIVO*

La evaluación farmacológica en el hombre está limitada por consideraciones técnicas, legales y éticas y la elección de los fármacos debe basarse en parte sobre su evaluación farmacológica en los animales<sup>350</sup>.

Las infecciones bacterianas en animales como modelo de enfermedad humana son útiles en la investigación de un nuevo antibiótico para establecer una correlación entre los resultados obtenidos *in vitro* y las concentraciones de antimicrobiano que protegen al animal, y su efectividad en las distintas situaciones clínicas y localizaciones orgánicas<sup>351</sup>.

Quizás el problema más difícil sea la licencia que se establece para las diferencias en el manejo del fármaco entre el animal y el hombre. Por ello, es necesario tener cierto conocimiento acerca de la farmacología comparada para decidir en qué medida las cualidades de un agente estudiado en animales pueden ser extrapoladas razonablemente al ser humano<sup>352</sup>, y elegir un modelo animal determinado para cada caso<sup>353, 354</sup>, cuyo valor va a depender directamente de la fidelidad de su parecido en la patogénesis, curso y resolución con la correspondiente infección humana.

Así, un efecto protector indica que el antibiótico alcanza el lugar de la infección y actúa en el medio ambiente especial de la lesión, información que no se consigue por ningún método *in vitro*. Lo más importante es que su capacidad para responder al tratamiento apropiado, después de que la lesión se haya establecido y su curso natural haya comenzado a desarrollarse, sea muy similar a como la infección en humanos debe responder al tratamiento, y que el efecto sobre el animal sea realmente medible y reproducible en límites imparcialmente estrechos<sup>352</sup>.

Además, los modelos experimentales permiten valorar diversas pautas de tratamiento con seguimiento microbiológico y anatomopatológico.

#### 1.4.1.- **Elección del conejo como modelo experimental**

Un número de consideraciones anatómico-fisiológicas entran en la elección de las especies para los experimentos animales. Así, en nuestro caso, la elección del conejo se vió respaldada por las siguientes:

Los **primates**, aunque han probado ser un buen modelo experimental en UC, son caros, difíciles de obtener, y presentan cierta dificultad de manejo para trabajar con ellos<sup>250</sup>.

Las **cobayas** tienen una córnea proporcionalmente más larga a otras especies y aproximadamente la mitad de su espesor está constituida por epitelio, lo cual podría afectar de forma adversa a la penetración y distribución de los fármacos en la córnea, dependiendo de sus propiedades lipo e hidrofílicas y de la vía de administración<sup>250</sup>.

El **conejo** ha probado ser un modelo experimental válido en el cual evaluar la quimioterapia de las infecciones oculares bacterianas<sup>355-361</sup>. Además, son fáciles de obtener y su manejo y mantenimiento no plantean grandes complicaciones.

No obstante, aunque existen diferencias en el comportamiento farmacocinético de los antibióticos entre el ojo del conejo y el humano, las similitudes lo hacen razonable para aplicar la información obtenida de una especie a otra, siempre que tengamos en cuenta las variables anatómicas y fisiológicas existentes entre ambos<sup>107, 362</sup>.

Así, debido a que el conejo parpadea poco, los fármacos administrados tópicamente no están redistribuyéndose de forma continua en la película lagrimal precorneal y ello puede disminuir su penetración corneal.

Además, el mayor volumen de humor vítreo en el ojo humano adulto que en el del conejo (aproximadamente cinco veces mayor)<sup>250</sup>, la mayor vascularización de la órbita del conejo y menor de la retina con respecto al humano, y el hecho de que la relación entre el

tamaño del ojo respecto al cuerpo sea mayor en el humano, van a influir en el comportamiento cinético de los antibióticos aplicados en inyección periocular. En consecuencia, las inyecciones periorbitales consiguen niveles de antibiótico en sangre substancialmente mas altas en conejos que las originadas por dosis comparables en humanos. Y las dosis a administrar deberán ser concordantemente menores que las que se dan a los conejos, aunque normalmente las dosis que se dan a los humanos no son mucho mayores que las que se aplican en los experimentos con conejos<sup>250</sup>.

Por ello, teniendo en cuenta que las recomendaciones habituales para el tratamiento se basan en la deducción de los resultados de los estudios farmacocinéticos en animales, la interpretación de los resultados estará influenciada también por los principios farmacocinéticos que controlan la penetración de los fármacos en el ojo, y el propósito del tratamiento deberá ser alcanzar la mayor concentración corneal del fármaco que pueda ser tolerado sin toxicidad<sup>249</sup>.

#### 1.4.2.- **Técnica de inoculación e inóculos que se ensayan**

Son muchos los autores que han desarrollado excelentes prototipos para simular queratitis bacterianas en humanos.

Así, puede producirse una infección experimental en la córnea después de su extracción por aplicación tópica de bacterias en el laboratorio<sup>250</sup>.

Otros investigadores<sup>256, 363, 364</sup> han simulado la situación clínica habitual mediante escarificación de la córnea seguido de la aplicación tópica de una suspensión de bacterias para provocar infección, pero ello ha originado dificultades a la hora de estandarizar y cuantificar los resultados.

Crompton y cols.<sup>365</sup> inyectaron bacterias en la cámara anterior del conejo para producir infección intraocular, pero los resultados fueron menos fiables que con la inoculación intracorneal directa o intravítrea, y ello puede ser debido a que el humor acuoso no resulta ser un buen medio de cultivo para el crecimiento bacteriano<sup>366-368</sup>.

Sin embargo, los resultados más consistentes se producen cuando los organismos se inoculan a través de agujas por microtrepanación directamente en el estroma corneal<sup>298, 369-371</sup>. Así se puede observar en los trabajos de Leopold y cols.<sup>366, 372</sup>, Bohigian y Foster<sup>364, 368</sup>, Kupferman y Leibowitz<sup>167, 264, 296</sup>, y Baum y Barza<sup>373</sup> realizados en conejos y en los de Davis y Chandler<sup>370</sup> y Davis y cols.<sup>256, 257, 282</sup>, en cobayas y en los que se utilizan como bacterias provocadoras de infección *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli* fundamentalmente.

Fernández Vigo<sup>31</sup> realiza estudios de técnicas de inoculación en conejos y concluye que en ningún caso los gérmenes producen infección conjuntival ni corneal tras la instilación simple sin erosión epitelial previa. Cuando se realiza erosión epitelial e instilación (UC traumática) se produce queratitis sólo con *P. aeruginosa* y *S. aureus*, pero no con los *Streptococcus spp.* Y cuando se realiza inyección intracorneal hay infección en el 100% de los casos de *P. aeruginosa* y *S. aureus*, en el 41% de *S. pneumoniae* y en el 71% de *S. pyogenes*.

Durantez Caccharro<sup>374</sup> realiza un estudio con 4 técnicas de inoculación con agresión corneal (UC traumática) en conejos, previa a la instilación de una suspensión de *P. aeruginosa* y concluye que la erosión epitelial no produce ningún tipo de reacción conjuntival ni corneal. Con la erosión más lesión intraestromal regular aprecia hiperemia conjuntival y edema corneal en la zona de agresión en las primeras 24 horas, que desaparece al tercer día. Con la erosión más lesión intraestromal irregular observa fuerte reacción conjuntival con mayor infiltración corneal y exudado mucopurulento en las primeras 24 horas, quedando un leve leucoma residual en el séptimo día. Con la inyección intracorneal encuentra una UC florida a las 24 horas en todos los casos.

Así pues, ambos autores encuentran la inyección intracorneal de gérmenes como método ideal para producir UC experimental, siendo los resultados de esta técnica más seguros y homogéneos que con las otras técnicas, y su eficacia en el caso de *P. aeruginosa*<sup>264, 369</sup> y *S. aureus*<sup>264, 375</sup> es del 100%. Y ello coincide con nuestros propios trabajos anteriores<sup>279</sup> y con los de Liolet<sup>376</sup> que encuentra en la conjuntiva de ojos sanos en humanos porcentajes importantes de *S. pneumoniae* (5'2%) y de *P. aeruginosa* (1'2%) sin producir ningún tipo de alteración patológica.

El inóculo óptimo para provocar una UC con esta técnica varía según el tipo de bacteria y su grado de virulencia. La mayoría de los autores<sup>256, 257, 296-298</sup>, han utilizado la inyección intracorneal de 10-20 µl de una suspensión estandarizada de bacterias que contiene 50-400 UFC, y se ha visto que tras un período de 4-8 horas las bacterias entran en una fase de crecimiento logarítmico en la córnea, alcanzando un pico de  $10^6$ - $10^7$  UFC a las 12-24 horas en que entran en una fase estacionaria de crecimiento, y se ha visto que en este intervalo de 24 horas y coincidiendo con la fase de crecimiento logarítmico se alcanza la infección corneal.

La utilización de inóculos con una concentración alta de bacterias se hace para no caer en el efecto de un bajo inóculo ( $< 10^7$ ), comentado ya por algunos autores<sup>31, 366, 370, 374</sup>, que sería superado por las defensas locales de la propia córnea y cámara anterior, más que a la acción antibacteriana del antimicrobiano.

En nuestro caso, la inyección intracorneal de 50 µl de una solución salina conteniendo microorganismos a una concentración entre 0'5 y 1 de la escala de Mc Farland fue suficiente para provocar una UC florida a las 24 h de la inoculación en todos los casos con *S. pneumoniae* y *P. vulgaris*.

#### 1.4.3.- Valoración de la eficacia antibiótica

Como primera medida para evaluar la eficacia antibiótica, Kupferman y Leibowitz<sup>167</sup> y Davis y cols.<sup>256</sup> utilizaron el recuento de bacterias en la córnea, aunque también se puede medir la concentración de los antibióticos en la córnea.

Davis y cols.<sup>256</sup> en 1977, realizan el recuento bacteriano mediante pulverización de la córnea entera en caldo y plaqueando alicuotas. En 1979 extraen las córneas tras 24 horas de tratamiento y las dejan en caldo, desde donde hacen cultivos cuantitativos por diluciones seriadas<sup>282</sup>.

Kupferman<sup>167</sup> en 1979, determina el número de bacterias viables a partir de una muestra de 10 mm de diámetro de córnea obtenida por trepanación una hora después de la última dosis de antibiótico. Y prepara un homogeneizado de las mismas en 2 ml de solución salina a 4° C en un micromezclador por 30 segundos; posteriormente, hace diluciones seriadas de la suspensión para su plaqueo y recuento.

También Baum y Barza<sup>373</sup> en 1983, realizan el recuento bacteriano tomando un botón de 7.5 mm de diámetro de córnea mediante trepanación después de haber aspirado el humor acuoso y sacrificado al animal tras 9 ó 17 horas de iniciar el tratamiento. Los botones se pesaron y homogeneizaron en un micromezclador Wheaton en un pequeño volumen de *buffer* fosfato (PBS). Las alicuotas del homogeneizado se diluyeron seriadamente y plaquearon para determinar el recuento de colonias viables; otras alicuotas se utilizaron para medir el contenido de antibiótico por bioanálisis por difusión en agar.

Nosotros, al igual que Davis y cols.<sup>282</sup>, a las 24 horas de finalización del tratamiento antibiótico extrajimos las córneas y las depositamos en solución salina que agitamos en un vortex durante 5 minutos, con el fin de proceder al recuento de las bacterias viables resuspendidas en el líquido de fase.

---

## 2.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS IN VITRO

### 2.1.- EVALUACIÓN DE LA CMI/CMB

Atendiendo a los resultados, destaca la gran sensibilidad que presentan los organismos gram positivos a rifampicina y a los aminoglucósidos, especialmente gentamicina, y también la mayor sensibilidad del *S. pneumoniae* a tiamfenicol. Y así, junto a otros autores que han descrito una mayor sensibilidad de los neumococos al cloranfenicol antes que a los aminoglucósidos<sup>53, 115, 146, 284-288</sup>, observamos también nosotros cómo rifampicina sería el antibiótico de elección para estos organismos, seguido de gentamicina y tobramicina para los *Staphylococcus* y del tiamfenicol para el *S. pneumoniae*. Ofloxacino sería la tercera opción, siendo su actividad frente a los *Staphylococcus* superior (de 8 a 64 veces) al tiamfenicol, e igual a la de gentamicina para el *S. pneumoniae* y por encima (el doble) de la actividad de tobramicina en este último caso, y su utilización se reservaría para aquellos casos en que se observase resistencia o reacciones de hipersensibilidad a estos antimicrobianos.

Era esperable la resistencia mostrada por los organismos gram negativos frente a rifampicina y tiamfenicol, aunque hemos de señalar que frente a *P. vulgaris* tiamfenicol presentó una sensibilidad intermedia. Ofloxacino resultó ser más sensible que gentamicina (16 veces) y tobramicina (el doble) frente a *E. coli* y *P. vulgaris*. Sin embargo, aunque posee muy buena actividad sobre *P. aeruginosa*<sup>70, 74</sup>, en nuestro trabajo vemos que tobramicina presenta una CMI más sensible (el doble) que la observada con ofloxacino, aunque esta sensibilidad supera en ambos casos a la de gentamicina. Y así, ofloxacino podría ser una buena alternativa para el tratamiento de las cada vez más frecuentes queratitis originadas por cepas de *P. aeruginosa* resistentes a gentamicina y tobramicina<sup>284</sup>. También, por su mayor sensibilidad frente a *Enterobacteriaceae*, sería de elección ante la sospecha de una queratitis por gram negativos.

Sin embargo, Osato y cols.<sup>115</sup>, en un estudio que utilizó microorganismos gram positivos y gram negativos procedentes de aislados clínicos de ojos que presentaban infección, describen sensibilidad frente a ofloxacino (CMI 90 = 2 µg/ml), encontrando resistencia frente a los aminoglucósidos: CMI 90 = 16 µg/ml para gram positivos frente a gentamicina y tobramicina, y CMI 90 = 8 µg/ml frente a gentamicina y CMI 90 = 16 µg/ml frente a tobramicina para gram negativos. Así mismo, los organismos gram negativos mostraron resistencia frente al cloranfenicol (CMI 90 > 128 µg/ml), y aunque su comportamiento frente a los organismos gram positivos fue mejor (CMI 90 = 16 µg/ml), se consideró de sensibilidad intermedia.

Richmann<sup>114</sup>, en un estudio experimental en conejos, compara la actividad de los colirios de ofloxacino, gentamicina y tobramicina al 0'3%, y encuentra que una sola dosis de ofloxacino mantiene niveles de concentración de antibiótico en lágrimas por encima de la CMI 90 de organismos gram positivos y gram negativos durante 5 horas, mientras que con gentamicina la concentración en lágrimas fue mayor que la CMI 90 de organismos gram positivos durante 20 minutos, y durante 2 horas frente a gram negativos. Con tobramicina, la concentración en lágrimas superó la CMI 90 para organismos gram positivos y gram negativos sólo durante 10 minutos.

Borrmann<sup>116</sup>, en un estudio con pacientes a los que se administró una gota de colirio de ofloxacino al 0'3% en ambos ojos cada 6 horas durante 10 días, encontró niveles de antibiótico en lágrimas de 1'2 a 22'2 µg/gm durante 4 horas, y ello sugiere que existe suficiente cantidad de antibiótico presente en la córnea durante ese tiempo que, además, supera la CMI de ofloxacino para la mayoría de los patógenos oculares.

En nuestro trabajo, ofloxacino mostró la mejor sensibilidad de todos los antibióticos, en general, frente a los organismos gram negativos, con una CMI que varió entre 0'03 y 0'5 µg/ml. Frente a los organismos gram positivos, presentó una CMI que varió entre 0'5 y 4 µg/ml, y que, en general, mostró una sensibilidad equiparable a la presentada por los aminoglucósidos, superior a la de tiamfenicol, y en cualquier caso

inferior a la gran sensibilidad que estos organismos presentan frente a rifampicina cuyas CMI oscilaron entre 0'015 y 0'03  $\mu\text{g/ml}$ . Aún así, vemos que estas CMI de ofloxacino, se hallan entre los rangos de concentración de antibiótico alcanzados en las lágrimas tras la administración de colirio de ofloxacino, descritos por Borrmann en el apartado anterior.

## 2.2.- EVALUACIÓN DEL EPA

Aunque en general se han descrito EPA intermedios y largos con quinolonas frente a organismos gram positivos<sup>209, 278</sup>, Fuursted y Zhanel<sup>377, 378</sup> describen EPA cortos de ciprofloxacino frente a *S. faecalis* y de norfloxacino y pefloxacino frente a *S. aureus*. En nuestro estudio ofloxacino no presentó EPA frente *S. pneumoniae* a concentraciones iguales a la CMI, pero al aumentar la concentración a 6'8  $\mu\text{g/ml}$  (~ 2 CMI) observamos un EPA corto, y a 10 CMI el EPA se alargó a casi 3 horas. Por otro lado, los *Staphylococcus* exhibieron un EPA corto cuando se expusieron a concentraciones iguales a CMI y 5 CMI, prolongándose hasta un valor intermedio a 10 CMI.

Frente a los organismos gram negativos, con quinolonas, se han descrito EPA largos o intermedios<sup>183, 237, 379-381</sup>. Sin embargo, nosotros a CMI obtuvimos unos resultados muy dispares. Así, no encontramos EPA significativo de ofloxacino frente a *E. coli*, aunque observamos un EPA largo para *P. vulgaris*, y corto para *P. aeruginosa*. Al aumentar la concentración de antibiótico a 10 CMI observamos EPA largos para *E. coli*, *P. vulgaris* y *P. aeruginosa*.

No obstante, hemos encontrado trabajos<sup>382, 383</sup> en los que se describen EPA cortos e intermedios para *E. coli* y *P. aeruginosa* expuestos a concentraciones de ofloxacino iguales a la CMI, alargándose estos tiempos de recuperación de 1 a 3 horas con exposiciones a 2-4 CMI y con EPA máximos a concentraciones de 25, 50 y 100 CMI. También Gobernado<sup>278</sup> describe EPA corto para lomefloxacino frente a *E. coli*.

Vemos pues, que *S. pneumoniae*, con una sensibilidad en el límite de la resistencia frente a ofloxacino, no presenta EPA a CMI, mientras que al aumentar la concentración hasta 10 CMI obtiene un EPA mayor al de los *Staphylococcus*, pareciendo ser el EPA un resultado más de la cantidad de antibiótico, que de la sensibilidad expresada en función de la CMI. Sin embargo, frente al *P. vulgaris* no encontramos un aumento significativo del EPA, con concentraciones de más de 100 veces la CMI.

No conocemos la existencia de estudios de EPA con tiamfenicol anteriores a los nuestros. Sin embargo, en trabajos realizados con cloranfenicol Craig y Gudmundsson<sup>181</sup> observan EPA intermedio en una cepa estándar de *S. aureus* a 4-5 CMI. Y Bundtzen y cols.<sup>182</sup>, con *E. coli* ATCC 25922, encuentran EPA significativo cerca de la CMI, intermedio a 4-5 CMI, y EPA máximo de 3 horas a 8 CMI. También, con aislados clínicos de *E. coli* y *Proteus mirabilis* se han descrito EPA cortos a 4 CMI<sup>182</sup> y, en general, se ha descrito EPA frente a organismos gram positivos y gram negativos cuando se ensaya a concentraciones de 5 y 10 CMI<sup>309</sup>.

Nosotros, con tiamfenicol observamos EPA cortos, en todos los casos, al ensayar con concentraciones iguales a la CMI. A 5 CMI y frente a *S. epidermidis* se observó todavía un EPA corto, pero al aumentar las concentraciones de antibiótico a 10 CMI observamos una prolongación del EPA hasta valores intermedios, siendo los períodos de recuperación más largos para *S. aureus* y *S. pneumoniae*.

Rifampicina presentó EPA corto frente a *S. pneumoniae* a concentraciones iguales a la CMI y este efecto se prolongó a un valor intermedio a 10 CMI. Con *S. aureus* -al igual que Craig y Gudmundsson<sup>181</sup>- observamos EPA corto a CMI, y EPA largo a 10 CMI, que coincide con el efecto de máximo EPA descrito por ellos para otra cepa estándar. También Drabu y Blakemore<sup>384</sup> obtienen EPA largos con 4 aislados clínicos y una cepa estándar de *Staphylococcus aureus*.

Frente a *S. epidermidis* obtenemos EPA intermedio a CMI y largo a 10 CMI, coincidiendo también con los largos EPA informados por Schmitt y cols.<sup>385</sup> obtenidos con una cepa patógena de *S. epidermidis* y altas concentraciones de rifampicina.

En cuanto a los organismos gram negativos, y al igual que otros autores<sup>181, 182</sup>, vemos que rifampicina a CMI origina un EPA más largo (~ 1'5 horas) frente a *E. coli*, que frente a *S. aureus* (~ 0'9 horas), y aunque ellos describen EPA máximo de 6'2 horas a 8 CMI, nosotros no encontramos recuperación de los cultivos después de 7 horas de seguimiento con concentraciones de 4, 10 y 40 CMI, sugiriendo un EPA largo (> 4 horas) en estos casos. No obstante, Bundtzen y cols.<sup>182</sup>, describen EPA intermedios y largos (de 1'5 a 3'6 horas) frente a aislados clínicos de *E. coli* expuestos durante 1 hora a concentraciones 4 veces la CMI de rifampicina.

Con *P. vulgaris* observamos EPA intermedio a CMI, que coincide con los EPA cortos e intermedios obtenidos por Bundtzen y cols.<sup>182</sup> con 2 cepas patógenas de *Proteus mirabilis* expuestas durante 1 hora a concentraciones 4 veces la CMI de rifampicina. Frente a *P. aeruginosa* encontramos EPA intermedio a CMI y largo a 10 CMI, y ello concuerda con los EPA largos informados por Gudmundsson y cols.<sup>386</sup>.

Así pues, rifampicina a CMI presenta los mayores EPA frente a *P. aeruginosa* y *S. epidermidis*, y el menor EPA corresponde a *S. pneumoniae*. A 10 CMI presenta EPA largos en todos los casos, siendo también los EPA más largos los correspondientes a *S. epidermidis* y a *P. aeruginosa*. Frente a *S. pneumoniae* el EPA a 10 CMI fue intermedio. Es curioso, cómo con valores de CMI resistentes para los organismos gram negativos, se obtienen valores de EPA del mismo rango que los de los organismos gram positivos. En este caso el EPA no guardaría relación con la sensibilidad presentada a los organismos, y sí con la cantidad de antibiótico.

Gentamicina a CMI presentó EPA cortos sobre los organismos gram positivos. Sin embargo, tobramicina a esta concentración tuvo unos períodos de recuperación más largos que dieron lugar a EPA intermedios para los *Staphylococcus* y todavía EPA corto para *S. pneumoniae*. Nuestros resultados coinciden con los de Martínez-Brocal<sup>387</sup>, el cual encuentra tiempos de EPA equiparables, al exponer durante 1 hora a *S. aureus* ATCC 29213 a concentraciones de gentamicina iguales y dobles a la CMI, utilizando una técnica de densidad óptica y otra de recuento en placa, obteniendo en ambos casos EPA cortos a CMI e intermedios a 2 CMI.

También McDonald, Bundtzen y Craig<sup>8, 182, 388</sup> encuentran EPA cortos tras breve exposición a concentraciones bajas de gentamicina sobre *S. aureus*; y Parker, Eagle y Lorian<sup>175, 177, 199</sup> describen EPA no significativos (< 0'5 horas) tras 1-2 horas de exposición a concentraciones séricas de aminoglucósidos frente a *Staphylococcus*. Sin embargo, Mattie y Rescott<sup>200, 203</sup> describen EPA largos con netilmicina.

Al aumentar la concentración de los aminoglucósidos encontramos, en algunos casos, dificultad en la cuantificación de las UFC. Así, con *S. pneumoniae*, concentraciones de 10 CMI de gentamicina no permiten el recrecimiento después de 7 horas, pudiendo decir, que el EPA será mayor de 5 horas. Sin embargo, con 10 CMI de tobramicina observamos una recuperación de los cultivos entre la 6ª y 7ª hora de seguimiento, resultando en un EPA largo de 3'4 horas. Cuando utilizamos un inóculo inicial bajo ( $10^6$  UFC/ml), nos fue imposible la cuantificación, ya que la dilución de los cultivos después de una hora de exposición al antibiótico nos dejó sin inóculo.

Con *S. aureus* a 10 CMI de gentamicina y tobramicina encontramos EPA intermedios. Sin embargo, la gran sensibilidad presentada por *S. epidermidis* a la acción de ambos aminoglucósidos nos llevó a ensayar con concentraciones menores, y así, observamos EPA intermedio con 5 CMI de gentamicina y no lo pudimos evaluar con concentraciones de 5, ni de 10 CMI de tobramicina.

Nos llaman la atención los resultados de Craig y Gudmundsson<sup>181, 182</sup>, que describen EPA no significativo (0'3 horas) para *S. aureus* expuesto a 4-5 CMI de gentamicina, y atribuyen estos resultados al gran poder bactericida del antibiótico que hace difícil la cuantificación, aunque con posterioridad Craig y Vogelmann<sup>5</sup>, y a la par ya con otros autores<sup>384, 386, 389, 390</sup>, que ensayan distintos métodos de determinación, coinciden con ellos en un EPA máximo de 3 a 7 horas con los aminoglucósidos, en general, frente a organismos gram positivos.

Y así, Isaksson y cols.<sup>202</sup>, con la técnica de recuento del ATP bacteriano, describen también EPA largos de 5 a 10 horas con *Staphylococcus* que habían sido expuestos a 4-8 µg/ml de gentamicina y tobramicina. Sólo en un caso, con un aislado clínico de *S. epidermidis* encontraron EPA de 0'5 a 2'5 horas a estas concentraciones, lo cual puede indicar la variabilidad, en algunos casos, dependiente de cada microorganismo específico, y no sólo de la especie bacteriana en general.

En cuanto a los organismos gram negativos, todos los autores<sup>181, 182, 202, 203, 387, 390</sup> vienen a coincidir en los resultados, describiendo EPA no significativos y cortos a CMI, intermedios a 4-5 CMI, largos por encima de 8 CMI y no recuperación de los cultivos a partir de 32 CMI para *E. coli*. Nosotros a CMI no encontramos EPA significativo para *E. coli* ni *P. vulgaris* con ninguno de los dos aminoglucósidos. Sin embargo, al aumentar las concentraciones de antibiótico a 10 CMI, encontramos EPA intermedio para gentamicina y tobramicina frente a *E. coli*. Con *P. vulgaris* observamos también EPA intermedio con gentamicina, pero no encontramos EPA con tobramicina. Sólo Gobernado<sup>278</sup> describe EPA intermedios de gentamicina frente a *P. mirabilis*.

Frente a *P. aeruginosa* se han descrito EPA un poco más largos<sup>181, 182, 202, 387, 391</sup>. Así, EPA cortos e intermedios se han informado a CMI, intermedios y largos a partir de 2-4 CMI y no recuperación de los cultivos a partir de 16 CMI. Nosotros a CMI obtuvimos EPA corto para tobramicina e intermedio con gentamicina. También aquí, observamos una buena correlación entre el EPA y la cantidad de antibiótico, y así, aunque tobramicina

presenta una CMI más sensible, 4 veces la de gentamicina, el EPA es menor, y ello se atribuye a la concentración de antibiótico y no a la sensibilidad al mismo. A 10 CMI obtenemos EPA largos con ambos aminoglucósidos, más para gentamicina (~ 5 horas) que para tobramicina (~ 3 horas) y ello es también un claro efecto atribuible a la cantidad de antibiótico como acabamos de señalar.

En general, y coincidiendo con Craig y Vogelmann<sup>5</sup> y demás autores<sup>193, 194, 202, 235, 391-393</sup>, podemos hablar de EPA máximo, de 2 a 7 horas, para los aminoglucósidos frente a organismos gram negativos. Por otro lado, Nilsson<sup>394</sup>, con la técnica del ATP bacteriano y tras la exposición de aislados clínicos y cepas de colección (*E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853) por una hora a altas concentraciones de antibiótico y con una dilución de  $10^{-3}$ , obtiene también EPA de 3 a 7 horas.

Observamos que para todas las combinaciones de antibiótico/microorganismo, al aumentar las concentraciones de los antibióticos aumenta el EPA, siendo pues, la existencia de EPA una función más dependiente de la concentración de antibiótico que de la sensibilidad del microorganismo al antibiótico, aunque en ocasiones vemos que sí existe una relación directa entre la CMI más sensible y el EPA, como por ejemplo es el caso de rifampicina a 10 CMI frente a los *Staphylococcus*. Sin embargo, *S. pneumoniae* muestra los mayores EPA a 10 CMI de ofloxacino, gentamicina y tobramicina, aunque frente a ellos presente una CMI en el límite de la resistencia en los dos primeros casos y resistente en el tercero. También *E. coli*, *P. vulgaris* y *P. aeruginosa* con una CMI resistente a rifampicina presentan los más largos EPA a CMI y 10 CMI, abonando la hipótesis de que el EPA sea aquí una función más de la cantidad de antibiótico que de la sensibilidad al mismo.

### 3.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS IN VIVO

#### 3.1.- EVALUACIÓN CLÍNICA

En ambos experimentos hay una clara diferencia entre los grupos que no recibieron tratamiento antibiótico y los que sí lo hicieron, y ello se evidenció no sólo en la rápida y grave evolución de la infección corneal en los grupos no tratados, sino también en las secuelas que se derivaron de ella, ya que todos estos ojos evolucionaron a la *ptisis bulbi*.

En el primer estudio no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos de profilaxis y los dos grupos de tratamiento considerados dos a dos en cuanto a la patogenicidad de los organismos inoculados. En general la afectación de los parámetros corneales y conjuntivales fue mayor en los grupos de tratamiento en la primera semana que en los grupos de profilaxis, y no hubo afectación uveal en ningún grupo.

Así pues, si comparamos los resultados entre los grupos de profilaxis no encontramos diferencias significativas entre los conejos infectados por *S. pneumoniae* y los infectados por *P. vulgaris* que recibieron profilaxis con ofloxacino, pero si las hallamos si los comparamos con los conejos de control que no recibieron tratamiento y vemos que en los grupos de profilaxis con ofloxacino los leucomas -si existieron- eran poco importantes y no había neovasos, al contrario de lo que ocurría en los grupos control donde la úlcera permaneció abierta junto a una gran reacción corneal, con un edema y leucoma que impidió visualizar la cámara anterior para ver la afectación uveal y una neovascularización que afectó a más de dos cuadrantes, junto a una gran reactividad conjuntival que pareció mejorar al final de la segunda semana.

No observamos diferencias significativas entre los dos grupos de profilaxis con ofloxacino pudiendo decir que la afectación corneal y conjuntival son superpuestas. Si bien en los tres primeros días el edema y la úlcera fueron un poco mayores en el caso del *P. vulgaris*, en ambos, la afectación corneal tendió a disminuir a partir del séptimo día, y en

el decimoquinto no encontramos ni úlcera, ni deformidad corneal y sólo en algunos casos persistió un leve leucoma residual. En cuanto a la afectación conjuntival, aunque en el grupo infectado por *P. vulgaris* quedó una leve hiperemia conjuntival en algún caso, en el grupo infectado por *S. pneumoniae* todos los parámetros conjuntivales eran normales en todos los casos al final del estudio.

Tampoco Zato y cols.<sup>279</sup>, en estudios previos con ofloxacino en la queratitis experimental en conejos, encuentran diferencias en la evolución clínica entre los conejos infectados por *S. aureus* y los infectados por *P. aeruginosa* que recibieron profilaxis con ofloxacino, pero, al igual que nosotros, sí las encontraron al comparar estos con los conejos que no recibieron tratamiento.

Lo mismo ocurre al comparar los resultados entre los grupos de tratamiento, donde no encontramos diferencias significativas entre los conejos infectados por *S. pneumoniae* y los infectados por *P. vulgaris* que recibieron tratamiento con ofloxacino, pero sí las hallamos si los comparamos con los conejos de control que no han recibido tratamiento y vemos que en los grupos de tratamiento con ofloxacino persiste un edema leve en algún caso, junto a un leucoma residual y neovascularización leves al final del estudio en todos los casos, y muy lejos de lo que sucede en los grupos de control.

Tampoco encontramos diferencias significativas entre los dos grupos de tratamiento con ofloxacino, pudiendo decir que tanto la afectación corneal como la conjuntival se superponen cualquiera que sea el microorganismo causante de la infección. Si bien el edema y la úlcera corneal son más importantes en los tres primeros días en el caso del *S. pneumoniae*, tienden a disminuir, en ambos, a partir del séptimo día. En todos los casos se observó persistencia de un leucoma leve y neovascularización al final del estudio, aunque la úlcera y la deformidad corneal desaparecieron. En cuanto a la afectación conjuntival, se normalizó en todos los casos al final del tratamiento, y sólo en un caso se observa leve hiperemia conjuntival en el grupo infectado por *P. vulgaris*.

Igualmente, Zato y cols.<sup>279</sup>, en el estudio reseñado anteriormente, encuentran una clara diferencia entre los conejos no tratados y los que recibieron tratamiento con ofloxacino a las 24 horas de producir la infección. También aquí encontramos una evolución hacia la *ptisis bulbi* en los ojos no tratados, mientras que en los que recibieron tratamiento la úlcera cerró en todos los casos y, en general, los signos clínicos mejoraron al final de la segunda semana. No obstante, la afectación fue más leve para el grupo infectado por *S. aureus* que para el grupo infectado con *P. aeruginosa*, donde en el decimoquinto día se observa mayor leucoma residual junto a persistencia de neovasos y ligero edema y deformidad corneales, atribuyéndose ello a la mayor patogenicidad de dicho microorganismo y también a la menor sensibilidad al antibiótico (CMI 90 = 0'5 µg/ml para *S. aureus* y CMI 90 = 2 µg/ml para *P. aeruginosa*).

Al evaluar los grupos de profilaxis y tratamiento de un mismo microorganismo vemos que existen diferencias significativas en algunos parámetros. Así, la presencia de neovasos y leucomas es menor en los grupos en los que se administra ofloxacino de forma profiláctica que en los grupos que inician el tratamiento a las 24 horas de provocada la infección. Y ello resalta la importancia que tiene la profilaxis antibiótica en este tipo de infecciones donde el curso evolutivo y la gravedad de las lesiones depende, en gran medida, de la rapidez en que se instaura el tratamiento antibiótico adecuado<sup>13, 57, 58, 249</sup>.

En nuestro estudio, ofloxacino mostró una eficacia al menos similar en la profilaxis y tratamiento de las úlceras corneales provocadas por *S. pneumoniae* y *P. vulgaris*, ya que en ningún caso en los que se instauró tratamiento los ojos evolucionaron a la *ptisis bulbi*, mientras que sí lo hicieron todos los ojos utilizados de control que no recibieron tratamiento, mostrando pues, su efectividad, y justificando, de este modo, su empleo en la profilaxis y tratamiento de esta clase de queratitis.

El segundo estudio puso de manifiesto, también, una gran diferencia en el caso de la evaluación clínica entre los conejos tratados con placebo y los tratados con fármaco activo,

---

pero no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los dos antibióticos utilizados.

Si comparamos los resultados entre los grupos de profilaxis no surgen diferencias estadísticamente significativas entre los conejos tratados con tiamfenicol y los tratados con tobramicina, mientras que sí se aprecian al comparar de forma aislada cualquiera de los dos grupos con los que recibieron placebo ( $p < 0'05$  a  $p < 0'001$ ; según el parámetro clínico evaluado).

Así, aunque todos los parámetros referidos a córnea, úvea anterior y conjuntiva mejoraron ostensiblemente en los dos grupos tratados con fármacos activos y al final sólo quedó un leucoma residual de 2-4 mm de diámetro junto a una neovascularización que no afectó a dos cuadrantes. Pareció existir una mayor afectación corneal para el grupo de profilaxis con tobramicina entre el tercero y séptimo día, no obstante estar ya cicatrizadas las úlceras. Encontramos también una reacción uveal leve junto con una afectación conjuntival entre moderada e intensa en el tercer día. Mientras que en el grupo de profilaxis con tiamfenicol no todas las úlceras habían cicatrizado en el séptimo día, no existió apenas reacción uveal y la afectación conjuntival fue entre leve y moderada. No obstante, en ambos grupos se inició la mejoría a partir del séptimo día y en el decimoquinto todos los parámetros conjuntivales se habían normalizado. Sin embargo, en el grupo de profilaxis con placebo se observó que los parámetros de afectación corneal empeoraban a lo largo del experimento, permaneciendo la úlcera abierta junto a una importante reacción corneal con un edema y leucoma que no permitían valorar la alteración uveal. Asimismo, hubo una gran reactividad conjuntival que pareció mejorar al final del estudio.

Al comparar los resultados entre los grupos de tratamiento tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los conejos tratados con tiamfenicol y los tratados con tobramicina, y sí las apreciamos al comparar de forma aislada cualquiera de los dos grupos con los que recibieron tratamiento con placebo. Y así, las mayores diferencias se hallaron en la afectación corneal ( $p < 0'005$  a  $p < 0'001$ ; según el parámetro clínico

evaluado), y en la hiperemia conjuntival ( $p < 0'005$ ), para ambos antibióticos, y para tobramicina comparada con placebo, en el caso de la secreción conjuntival ( $p < 0'001$ ).

Vemos pues, que los parámetros de afectación corneal en el grupo de tratamiento con placebo empeoran de forma considerable a lo largo del estudio, manteniéndose la úlcera abierta en todos los casos. Los parámetros uveales no se pudieron evaluar debido a la opacidad de los medios y la afectación conjuntival fue de intensa a moderada. Sin embargo, en los grupos de tratamiento con tiamfenicol y tobramicina la evolución fue mucho mejor, y aunque el edema persistió en forma leve al final de la segunda semana en ambos grupos por igual, los leucomas y la neovascularización residual parecieron afectar más en el grupo del tiamfenicol que en de los tratados con tobramicina. En cuanto a las úlceras, en el grupo de tobramicina han cicatrizado en todos los casos en el séptimo día, mientras que en el grupo del tiamfenicol todavía se observa alguna pequeña úlcera ( $< 2$  mm), pero todas han cicatrizado al final del estudio. Apenas existe afectación uveal en los dos grupos de tratamiento con antibiótico y la afectación conjuntival se superpone en ambos grupos con una hiperemia conjuntival y ciliar entre moderada e intensa en los primeros días, que se normalizó al final del estudio en todos los casos, quedando tan sólo una pequeña secreción en algún caso.

Por último, al evaluar los grupos de profilaxis y tratamiento de un mismo antibiótico hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0'05$ ) en algunos parámetros (edema corneal), tanto en el caso del tiamfenicol como en el de la tobramicina, lo cual no hace más que afianzar la idea de la importancia que tiene en las queratitis bacterianas la instauración de un tratamiento antibiótico lo antes posible<sup>395</sup>.

Por tanto, los dos antibióticos demostraron su eficacia en la profilaxis y tratamiento de las úlceras corneales provocadas por *S. pneumoniae*, ya que sólo en los casos en los que se utilizó placebo los ojos evolucionaron a la *ptisis bulbi*. De lo que se deduce que al menos para las queratitis provocadas por *S. pneumoniae* ambos antimicrobianos presentan una actividad antibacteriana *in vivo* similar.

Aunque los dos estudios se realizaron en dos épocas distintas en el tiempo, la metodología utilizada y la pauta de tratamiento que se siguió tanto en los grupos en los que se utilizó el antibiótico de forma profiláctica como en los que se instauró el tratamiento una vez que la úlcera fue provocada, en el caso del *S. pneumoniae* nos permitió realizar una aproximación comparativa de la actividad de los antimicrobianos utilizados en este modelo.

Y así, en los grupos de profilaxis antibiótica vemos que existió menor afectación corneal en los ojos tratados con ofloxacino a lo largo de las dos semanas, mientras que la afectación pareció superpuesta en los ojos tratados con tiamfenicol y tobramicina, aunque en el séptimo día pareció apreciarse una mayor afectación en los grupos de tratamiento con tobramicina. Al final, en estos dos grupos pudimos observar leucomas residuales y neovascularización entre leves y moderados, mientras que en el caso de ofloxacino, si existieron, fueron muy leves.

No encontramos reacción uveal en ningún momento en los grupos de profilaxis con ofloxacino y tiamfenicol, pero sí existió una leve reacción uveal en el grupo de tobramicina en los tres primeros días. En cuanto a la afectación conjuntival, vemos que en el tercer día existió mayor afectación, en general, para el grupo de tobramicina, seguido de tiamfenicol, siendo los ojos correspondientes al grupo tratado con ofloxacino los que presentaron menor afectación. Sin embargo, la afectación pareció superponerse en los tres grupos desde el séptimo día y hasta el decimoquinto, en el que todos los parámetros se habían normalizado en todos los grupos.

Así pues, aunque no encontramos diferencias significativas entre los tres antibióticos, podemos decir que ofloxacino se comportó un poco mejor que los otros dos, ya que aunque en todos los casos la úlcera se cerró, la evolución desde el primer día fue algo más leve con ofloxacino que con tiamfenicol y tobramicina y, además, las lesiones residuales -cuando existieron- fueron mucho menores. Por otro lado, aunque los resultados finales se superponen en el caso del tiamfenicol y en el de tobramicina, en la primera semana pareció existir una mayor afectación en los ojos tratados con tobramicina.

En cuanto a los grupos de tratamiento antibiótico vemos que aunque en los tres primeros días pareció existir menor afectación corneal en el grupo de tobramicina y mayor en el de ofloxacino, en el séptimo día fue más manifiesta en el grupo de tiamfenicol y se superpuso en los otros dos. Al final de la segunda semana la afectación fue similar en los tres grupos, encontrando leucomas y neovascularización residual quizás más notable en el grupo del tiamfenicol. El edema corneal -leve en los grupos de tiamfenicol y tobramicina- apenas existe en el grupo de ofloxacino.

La reacción uveal fue mínima para los grupos de tiamfenicol y tobramicina, y no existió para ofloxacino. La afectación conjuntival se superpuso en los tres grupos durante todo el período de estudio, si bien en los grupos de tiamfenicol y tobramicina queda alguna pequeña secreción en algún caso, en el grupo de ofloxacino todos los parámetros son normales al final del estudio.

Tampoco aquí encontramos diferencias significativas entre los tres antibióticos. Aunque, el edema corneal fue menor al final del tratamiento en el grupo de ofloxacino, todas las úlceras cerraron al final del tratamiento.

Todo ello no hace mas que poner de manifiesto la efectividad -al menos similar- de los tres antibióticos, en la profilaxis y tratamiento de las úlceras corneales provocadas por *S. pneumoniae*.

No hemos encontrado estudios que detallen con tanta precisión como nosotros la evolución de los síntomas a lo largo del tratamiento. En general, los autores describen si existe mejoría con el tratamiento y en qué porcentaje. Sólo Fernández Vigo<sup>31</sup> utiliza también una tabla semiográfica para valorar las lesiones.

Mitsui y cols.<sup>396</sup>, en varios estudios realizados en Japón con pacientes que presentaban infecciones bacterianas externas del ojo, entre las que se incluían queratitis, úlceras corneales y abscesos corneales, describieron una efectividad de buena a mejor en el

93% de los casos, con una disminución significativa de los signos clínicos y síntomas de infección, así como erradicación de los organismos en la mayoría de los casos tratados con una solución tópica de ofloxacino al 0'3% instilando una gota cada ocho horas, y sólo en un 7% el resultado se evaluó como pobre.

### 3.2.- EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA Y ANATOMOPATOLÓGICA

En el primero de los estudios vemos que existe una buena concordancia clínica/microbiológica en los grupos que recibieron profilaxis y tratamiento antibiótico con ofloxacino, pero no en el grupo que no recibió tratamiento.

Y así, junto a una menor afectación clínica en el grupo de profilaxis observamos una negativización de los cultivos durante todo el experimento.

En el grupo de tratamiento la mayor afectación en los primeros días coincide con una positividad de los cultivos en el tercer día del 33'3% para *S. pneumoniae* y del 50% para *P. vulgaris*. En el séptimo día, la positividad de los cultivos se mantiene en un 16'6% de los casos en las córneas infectadas por *P. vulgaris*, y ello se correlacionó bien con la mayor agresividad de los signos clínicos provocados. En el decimoquinto día, la negativización de los cultivos coincide con la cicatrización de las úlceras.

Sin embargo, pudimos observar una discrepancia clínica/microbiológica en el grupo de control. Y así, aunque todos los ojos de los conejos que no recibieron tratamiento evolucionaron a la *ptisis bulbi*, los cultivos de los raspados corneales sufrieron un proceso de negativización a lo largo de las dos semanas del ensayo, y de una positividad del 66'6-100% en el tercer día, se pasó al 33'3% al final de la primera semana y a un 0% a los 15 días.

Y aunque otros autores<sup>256, 369</sup> han descrito resolución espontánea en la mayoría de los modelos experimentales de infección ocular, en contraste con la experiencia en humanos, esto no ocurrió en nuestro caso. Y nos llevó a realizar en el segundo experimento un estudio anatomopatológico de uno de los ojos del grupo placebo, elegido al azar, así como, también, un recuento de las bacterias en la córnea extraída a las 24 h de finalizar el ensayo, con el fin de evaluar la acción de los antibióticos.

En el segundo experimento, aunque desde el punto de vista clínico no encontramos diferencias significativas en la evolución de la infección corneal entre ninguno de los dos antibióticos utilizados (tobramicina y tiamfenicol), sí las hubo en el resultado de los cultivos corneales.

Así, mientras los cultivos procedentes de los ojos que recibieron profilaxis antibiótica fueron negativos durante todo el experimento en el caso de la utilización de tobramicina, se registró una positividad del 83'3% en el tercer día para los que recibieron tiamfenicol, aunque desde el séptimo día los cultivos fueron negativos en ambos grupos.

También en los cultivos procedentes de los grupos de tratamiento antibiótico se registró una mayor positividad en el tercer día para los tratados con tiamfenicol que para los que recibieron tobramicina (33'3% frente a un 16'6%). No obstante, a partir del séptimo día todos los cultivos se negativizaron en ambos grupos, estando ello en consonancia con la mejoría de los signos clínicos que se observaron en la segunda semana.

En cuanto a los cultivos procedentes de las córneas del grupo de profilaxis con placebo, y al igual que en el primer estudio, observamos que eran positivos en un 66'6% de los casos en el tercer día, pero negativos desde la primera semana y hasta el final del experimento.

Sin embargo, una positividad del 16'6% se mantuvo durante las dos semanas que duró el experimento en el grupo de tratamiento con placebo, poniendo de manifiesto el

mantenimiento del proceso infeccioso y en buena correlación con la impresión clínica y el estudio anatomopatológico que nos mostró la gravedad de los procesos inflamatorios desencadenados por la infección bacteriana, que ocasionaron la destrucción del globo ocular. De hecho, un conejo perteneciente al grupo de profilaxis con placebo y otro perteneciente al grupo de tratamiento con placebo murieron antes de finalizar el estudio, presumiblemente por diseminación de la infección.

También Zato y cols.<sup>279</sup> describen en un ensayo con ofloxacino en el tratamiento de la queratitis por *S. aureus* y *P. aeruginosa*, una positividad del 40% en el tercer día y negativización del 100% a partir del 7° día en los cultivos en el caso de la utilización profiláctica del antibiótico, mientras que cuando se instaura el tratamiento a las 24 horas de la infección los cultivos son positivos en un 40% en el 7° día y sólo a los 15 días son negativos al 100%.

Por otro lado, Mitsui y cols.<sup>396</sup>, en un estudio con pacientes con infecciones del polo anterior del ojo que fueron tratados con una gota de colirio de ofloxacino al 0.3% cada ocho horas, describen negativización de los cultivos entre el 4° y 7° día, unido a una mejoría de los síntomas, en general, a partir del séptimo día. Encontrando pues una buena correlación clínica/microbiológica en el tratamiento de este tipo de infecciones entre las que se incluía la úlcera corneal bacteriana.

Hirose y cols.<sup>397</sup> describen el éxito de un tratamiento tópico con ofloxacino en el caso de un paciente que presentaba queratitis superficial con úlceras corneales severas en ambos ojos originadas por *P. aeruginosa*, no aislándose bacterias desde el día siguiente a la instauración del tratamiento y asociándose también a una desaparición rápida del exudado purulento.

En cuanto a la técnica empleada para el recuento de bacterias en la córnea extraída a las 24 horas de finalizar el tratamiento<sup>282</sup>, encontramos que sólo en 4 córneas de un total de 33 aislamos bacterias, y estos casos correspondieron a grupos de ojos en los que se

---

realizó profilaxis antibiótica (2 con tobramicina y 2 con tiamfenicol), siendo todos los casos en los que se instiló placebo y tratamiento antibiótico negativos en cuanto al aislamiento microbiológico de bacterias al final del experimento.

El hecho de que en el primer experimento observásemos una negativización uniforme de los cultivos de las córneas que no recibieron tratamiento independientemente de la bacteria que se ensayase y que en el segundo experimento no se hallase aislamiento bacteriano desde ninguna de las córneas extraídas correspondientes a los grupos que recibieron placebo, junto a unos cultivos en el decimoquinto día no homogéneos en cuanto a la negativización, nos hizo pensar por un lado, que es posible que el medio ambiente de inflamación y destrucción celular existente en el ojo infectado y no tratado sea inadecuado para que la bacteria sobreviva por falta de elementos nutritivos y por ello su aislamiento sea difícil de valorar.

Y por otro lado, nos llevó también a pensar que quizás fuese necesario mejorar la técnica con un homogeneizado de la córnea extraída, con el fin de evitar errores correspondientes a la permanencia de bacterias firmemente adheridas al tejido corneal y por tanto imposibles de cuantificar desde la agitación y dilución seriada de la solución salina en la que las depositamos tras su extracción.

Sin embargo, Kupferman<sup>167</sup>, en un modelo experimental en conejos con UC por *P. aeruginosa*, al realizar un homogeneizado en solución salina de las córneas extraídas una hora después de finalizada la instilación antibiótica, encuentra resultados variables en función de los antibióticos que ensaya y la dosis empleada, y así, en algunos casos, encuentra mayor cantidad de microorganismos en ojos que han recibido antibiótico, que en ojos que no lo han recibido. Por ejemplo, no hubo diferencias entre el número de UFC de las córneas tratadas con neomicina y los controles.

También, Davis<sup>282</sup>, en un modelo experimental en cobayas y conejos con UC por *P. aeruginosa*, describe resultados variables en función de la vía de administración de los

fármacos, y así, en algunos, casos encuentra mayor cantidad de microorganismos en ojos que han recibido tratamiento antibiótico con tobramicina, que en ojos que han recibido placebo con ClNa 0'15 M. No obstante, el tratamiento tópico con tobramicina siempre resultó mejor -en cuanto al número de UFC- en las córneas tratadas con el antibiótico que en las tratadas con placebo.

Vemos pues, que no existe uniformidad en los resultados de los cultivos de los ojos que no reciben tratamiento, y quizás sea debido más al daño irreversible que la infección provoca, y que imposibilita el crecimiento bacteriano por la destrucción celular y microambiental del ojo una vez la infección se ha establecido, que a la técnica de recuento empleada.

#### **4.- SIGNIFICADO BIOLÓGICO DEL EPA Y SU INFLUENCIA EN LA DOSIFICACIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS EN UN ENSAYO EXPERIMENTAL**

Podría esperarse que el EPA tuviera una primera aplicación sobre las pautas de administración de los antibióticos. Así, combinaciones de antimicrobiano/microorganismo que no muestren EPA significativo requerirían dosificaciones que mantuvieran continuamente niveles mayores a la CMI, mientras que aquellas combinaciones con EPA prolongado permitirían, con dosificación intermitente, que los niveles de antibiótico en suero y tejidos cayeran por debajo de la CMI durante un intervalo de tiempo considerable sin permitir el recrecimiento bacteriano y la pérdida de eficacia del antimicrobiano.

Los antibióticos actúan sobre los microorganismos inhibiendo su crecimiento y/o provocando la muerte celular. Su rango de acción va progresivamente desde la producción de alteraciones bioquímicas y morfológicas a la destrucción de las estructuras celulares esenciales de la bacteria que llevan a la inhibición del crecimiento y finalmente muerte de los organismos<sup>12</sup>.

Si un agente antimicrobiano produce una pérdida rápida de la viabilidad celular (máximo 1-2 horas) en la población a la cual se expone se considera bactericida, pero si la población expuesta mantiene una meseta de viabilidad respecto al tiempo se considera bacteriostático<sup>398</sup>. Numerosas experiencias clínicas han probado que puede no ser necesario mantener niveles de fármacos continuamente bactericidas en sangre o fluidos tisulares para conseguir un efecto terapéutico.

Así, la investigación de varias pautas de administración de penicilina G <sup>178, 215, 399-408</sup> sugirió que muchas infecciones podrían tratarse, adecuadamente, con antibioterapia intermitente. En la fiebre escarlatina se llegó a la conclusión de que mientras el fármaco se detectaba en la sangre por 6 horas al día, desde el punto de vista clínico y bacteriológico se obtenía la curación<sup>409, 410</sup>. El éxito del tratamiento intermitente en estos estudios en

animales y en humanos se atribuyó, al menos en parte, al EPA. Y ello se ha visto en otros tipos de infección, incluyendo queratitis bacterianas.

Los estudios de cinética de la actividad bactericida con respecto a la concentración han puesto de manifiesto que existen diversas categorías de antibióticos que también quedan reflejadas en el EPA. Y ello se observa en nuestro estudio donde ofloxacino, tiamfenicol, rifampicina, gentamicina y tobramicina muestran que con las concentraciones ensayadas frente a estos organismos, incrementos en la concentración causan un aumento en la prolongación del EPA *in vitro*.

La respuesta al daño inducido al ADN por las 4-Quinolonas es multifacética y especie-dependiente<sup>411</sup>. Las quinolonas inhiben la ADN-gyrase bacteriana y el efecto principal de esta inhibición está en la replicación y transcripción del ADN.

Ofloxacino, con una acción bactericida que aumenta con la concentración hasta alcanzar un máximo a partir del cual la acción bactericida disminuye<sup>316, 412</sup> (esto es lo que se llama efecto paradójico), muestra EPA cortos que se prolongan al aumentar las concentraciones de antibiótico hasta un máximo en el cual, pese a multiplicar las concentraciones, no se consigue aumentar el EPA, como vemos ocurre en el caso de *Proteus vulgaris* a 6'8 µg/ml.

El EPA alude a la inhibición continua de la división celular en términos de recuentos siguientes a la exposición transitoria a un antibiótico. Guan y cols.<sup>413</sup> han demostrado que las células tratadas con quinolonas no tienen una recuperación completa en el tiempo en que el EPA clásicamente definido ha terminado, y sugieren que la síntesis de ADN por unidad de célula proporcionaría una medida exacta del tiempo requerido por las células tratadas con quinolonas para recuperarse totalmente.

Tiamfenicol, aún teniendo una actividad fundamentalmente bacteriostática, muestra un incremento del EPA al aumentar las concentraciones, más para organismos gram

positivos que para gram negativos, y ello podría relacionarse con la mayor sensibilidad antibiótica frente a los primeros.

Rifampicina, con acción bactericida sobre los organismos en fase de crecimiento, incrementa su actividad al aumentar las concentraciones de antibiótico. Asimismo los EPA se prolongan con los incrementos en la concentración hasta un máximo en el que pese a multiplicar las concentraciones de antibiótico, no se consigue aumentar el EPA.

Gentamicina y tobramicina, con un marcado efecto bactericida dependiente de la concentración, producen *in vitro* un incremento del EPA cuando aumentamos su concentración. La cantidad de fármaco, más que la frecuencia de administración determina su eficacia. Además, altos picos pueden reducir la aparición de resistencia, y una sólo dosis al día puede disminuir la toxicidad renal y ótica.

La presencia de un EPA prolongado sugiere que el antibiótico podría ser administrado con menor frecuencia que lo que se sugiere por su vida media. Si hay EPA *in vivo*, los niveles del antibiótico en el tejido de infección pueden disminuir bajo la CMI sin recrecimiento bacteriano en la última parte del intervalo de dosis.

Incluso en estudios recientes de dosificación *in vivo* se ha mostrado que para algunos antibióticos es posible calcular el intervalo de dosificación óptimo por la suma del tiempo sobre la CMI y la duración del EPA. Se sabe que el EPA está relacionado con el AUC de la concentración del antibiótico y el tiempo de exposición. Y autores como Turnidge<sup>414</sup> han desarrollado una fórmula matemática que nos da el intervalo óptimo de dosis conociendo:

- 1) los parámetros farmacológicos del antibiótico y la dosis;
- 2) la CMI de los organismos y
- 3) la relación entre el AUC y el EPA para cada combinación de antimicrobiano/microorganismo.

La efectividad de las pautas de administración de los antibióticos se ve influenciada en gran medida por los efectos que las concentraciones de los antibióticos tienen en el lugar de infección sobre la población bacteriana dinámica tras una sólo dosis y los efectos acumulativos de dosis múltiples intermitentes. Y estos efectos farmacológicos envuelven, por un lado, a la tasa de acción bactericida y a la extensión de la supresión del crecimiento de las bacterias en los tejidos y, por otro, al EPA<sup>415</sup>. Si bien las concentraciones alcanzadas son, obviamente, una función de la cantidad de droga administrada, también dependen de las características farmacocinéticas de cada antibiótico<sup>252</sup>.

Nuestro estudio con ofloxacino, tiamfenicol, rifampicina, gentamicina y tobramicina muestra que incrementos en la concentración causan un aumento en la prolongación del EPA *in vitro*. Y ello está en consonancia con los resultados de otros investigadores del EPA tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>416</sup>, cuya primera aplicación clínica ha sido la dosis única con aminoglucósidos<sup>417</sup>.

La observación experimental ha sugerido que la efectividad de los tratamientos tópicos antibacterianos frente a las queratitis bacterianas se incrementa por intervalos cortos de dosificación<sup>167</sup>. Con gentamicina y ofloxacino por vía tópica se ha visto que pautas que usan dosis de carga seguidas producen concentraciones en córnea y en humor acuoso más altas que pautas con dosis aisladas. Sin embargo, otros factores que las técnicas de dosificación pueden afectar a los niveles de fármacos alcanzados en los ojos tras la administración de agentes antimicrobianos<sup>418</sup>.

Con norfloxacin se ha visto que una dosis cada 8 horas de colirio al 0'3% era ligeramente superior en eficacia clínica a una dosis cada 12 horas y también superior a la instilación de un aminoglucósido cada 6 horas en el tratamiento de infecciones profundas de los ojos como dacriocistitis y úlcera corneal. Sin embargo, en las infecciones superficiales, la administración cada 12 horas puede ser suficiente para curar la infección, evitando de esta forma a los pacientes el tener que llevar el frasco de colirio durante el día.

Los niveles de antimicrobiano dependerán de la concentración de la preparación antibiótica y del régimen de dosificación empleado. Se ha visto que aumentando las concentraciones del colirio aumentan los niveles de antibiótico en lágrimas, conjuntiva, córnea e incluso suero<sup>163, 419</sup>. Múltiples aplicaciones incrementan estos niveles en la película lagrimal preocular y corneal con cada secuencia de aplicación. Y así, en estudios experimentales de queratitis por *P. aeruginosa* en hámster se ha sugerido que un aumento en la concentración de antibiótico sobre los comercialmente disponibles resulta más efectivo en el tratamiento tópico con agentes antibacterianos. Parece razonable, pues, asumir que reduciendo el intervalo entre dosis se alcancen mejores resultados<sup>167, 256, 257</sup>.

Si la efectividad del tratamiento tópico se basa en la obtención de concentraciones superiores a la CMI de cada cepa bacteriana específica en la región precorneal y en el mantenimiento de esos niveles entre dosis. Cabe suponer, por tanto, que con las dosis que se utilizan habitualmente en la clínica diaria la efectividad de estos antibióticos será mucho mayor.

Sin embargo, si un agente es relativamente no tóxico -de modo que una concentración varias veces superior a la terapéutica para el tratamiento puede ser bien tolerada- es posible aplicar una estrategia de dosis máxima, y el intervalo entre dosis puede ser mucho más prolongado que la vida media.

Por los resultados *in vitro* frente a las dos cepas ensayadas, se sugiere que la dosificación de ofloxacino frente a *P. vulgaris* podría ser más espaciada que frente a *S. pneumoniae*, el cual requeriría una dosificación mayor y más frecuente que el primero. No obstante, -para el *S. pneumoniae*- el tiamfenicol, ejercería una actividad antibacteriana al menos similar a la de ofloxacino y tobramicina, con menor cantidad de antibiótico.

Los cultivos negativos durante todo el tiempo del estudio en los dos grupos de profilaxis con ofloxacino y en el de tobramicina, junto a los cultivos negativos desde la primera semana en el grupo de profilaxis con tiamfenicol y en los grupos de tratamiento de

---

los tres antibióticos y la mejoría de los signos clínicos de infección, con menores secuelas y afectación en los grupos de profilaxis, nos indica que el tratamiento antibiótico resultó eficaz para erradicar las bacterias de la córnea y que sólo en algunos casos debería prolongarse por unos días más o bien aumentar la concentración o frecuencia de administración para su total erradicación.

Vemos también, que la profilaxis y tratamiento con ofloxacino es mejor que la ausencia de tratamiento frente a la úlcera corneal experimental debida a *P. vulgaris* y tan efectivo como tobramicina o tiamfenicol en la profilaxis y tratamiento de la úlcera corneal bacteriana experimental debida a *S. pneumoniae*.

En nuestro estudio, la dosis utilizada de 2 gotas cada 8 horas fue suficiente para mantener una supresión del crecimiento bacteriano en el intervalo entre dosis, así como una concentración en las lágrimas terapéuticamente eficaz, como se desprende de los resultados obtenidos.

Por tanto ofloxacino, por su buena distribución intraocular y corneal, su fuerte actividad bactericida a bajas concentraciones y el EPA significativo frente a bacterias gram positivas y gram negativas (incluida *P. aeruginosa*) es un antibiótico que tiene efectividad en este tipo de infecciones, al menos similar a tiamfenicol, rifampicina y aminoglucósidos y puede tener una duración mayor de acción terapéutica en las superficies externas de los ojos que estos<sup>114</sup>.

Por otro lado, su buena tolerabilidad sistémica y local, junto a sus propiedades farmacocinéticas y la no evidencia de efectos secundarios o toxicidad a nivel ocular como se ha visto en distintos estudios en pacientes con infecciones bacterianas externas del ojo durante el tratamiento con ofloxacino tópico al 0'3% instilado cada 8 horas<sup>396</sup>, lo hacen interesante en colirio para el tratamiento de las enfermedades infecciosas del polo anterior<sup>137</sup>.

No obstante, antes de que ninguna pauta nueva de tratamiento basada en parámetros farmacodinámicos tales como el EPA pueda ser propugnada, los ensayos clínicos prospectivos deben haber demostrado una mejora en la eficacia y una menor toxicidad o mantener resultados similares a menor precio respecto de las pautas aceptadas en la práctica médica común. Sin embargo, se necesitan más estudios en animales y ensayos clínicos humanos para verificar estas observaciones iniciales y determinar el último significado clínico del EPA.

## **VI.- CONCLUSIONES**

1. La inyección intraestromal de la córnea fue eficaz en el 100% de los casos para producir una úlcera corneal, encontrando unos resultados homogéneos y seguros en la producción experimental de las úlceras corneales bacterianas por *Streptococcus pneumoniae* y *Proteus vulgaris*.
2. La concentración mínima inhibitoria y bactericida de ofloxacino frente a los microorganismos gram positivos y gram negativos estudiados, se halló dentro de los intervalos de concentración que se alcanzan en la película lagrimal precorneal tras una sola dosis de colirio de ofloxacino al 0'3%.
3. Ofloxacino presentó el mejor rango de concentración mínima inhibitoria y bactericida de todos los antibióticos aquí estudiados frente a los organismos gram negativos. Frente a los organismos gram positivos, ofloxacino -junto a los aminoglucósidos- presentó también el mejor rango de concentración mínima inhibitoria y bactericida, después de rifampicina.
4. El efecto postantibiótico de ofloxacino, variable según la especie, permitiría espaciar la dosificación de los tratamientos cuando el agente etiológico responsable de la úlcera corneal fuese un microorganismo gram negativo, y aconsejaría aumentar la frecuencia en las dosis o su concentración, frente a los organismos gram positivos, permitiendo, en este caso, el efecto postantibiótico largo e intermedio a altas concentraciones, espaciar el intervalo entre dosis, beneficiando en ello la comodidad de una menor aplicación sin pérdida de la eficacia.
5. La aplicación tópica de 2 gotas/8 horas/15 días fue suficiente para erradicar la infección y cerrar la úlcera corneal, poniendo de manifiesto la buena penetración corneal de los tres antibióticos por esta vía de administración.

6. La aplicación profiláctica del antibiótico cuando aún no se ha establecido la infección corneal origina una mejor evolución, con menor presencia de neovasos y leucomas residuales y, aunque en todos los casos la úlcera corneal cicatriza, destaca una menor afectación, con menor edema corneal, en los casos en que el antibiótico utilizado fue ofloxacino.
7. El tratamiento antibiótico una vez establecida la úlcera corneal bacteriana fue eficaz en la resolución de la misma. Aunque en estos casos el curso evolutivo resultó en una mayor afectación corneal en comparación con los grupos en los que se inició tratamiento profiláctico, también aquí los ojos tratados con ofloxacino presentaron una menor afectación.
8. Ofloxacino fue tan eficaz como tiamfenicol y tobramicina en la profilaxis y tratamiento de las úlceras corneales provocadas por *Streptococcus pneumoniae*. Asimismo fue eficaz en la profilaxis y tratamiento de las úlceras corneales originadas por *Proteus vulgaris*.
9. El estudio del efecto postantibiótico y su implicación en la adopción de nuevas pautas en el tratamiento de las queratitis bacterianas, debe ser avalado primero por ensayos en modelos animales que permitan validar la eficacia de estas nuevas pautas y, sólo así, poder determinar su significado clínico real con estudios prospectivos en humanos.

## **VII.- BIBLIOGRAFÍA**

- 1) Dámaso D. Historia de los antibióticos y quimioterápicos. En: Marketing Pharm, S.A., (ed.): Antibacterianos. 1990; 1:1-9.
- 2) Conticello S. 2º Congreso de antibióticos en otorrinolaringología. Barcelona 13/15 Marzo 1991. Entrevista. Forum Farma 1991; 40:11.
- 3) Harofarma, (ed.): Selección de monografías Beecham. 1981; Prólogo:3.
- 4) Vogelman BS, Craig WA. Postantibiotic effects. J Antimicrob Chemother 1985; 15 Suppl A:37-46.
- 5) Craig WA, Vogelman BS. The postantibiotic effect. Ann Int Med 1987; 106(6):900-2.
- 6) Vogelman BS, Craig WA. Kinetics of antimicrobial activity. J Pediatric 1986; 108 Suppl 2:835-40.
- 7) McDonald PJ, Wetherall BL, Pruul H. Postantibiotic leukocyte enhancement: increased susceptibility of bacteria pretreated with antibiotics to activity of leukocytes. Rev Infect Dis 1981; 3:38-44.
- 8) McDonald PJ, Craig WA, Kunin CM. Persistent effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* after exposure for limited periods of time. J Infect Dis 1977; 135:217-23.
- 9) Baum JL, Silbert AM. Aspects of corneal wound healing in health and disease. Trans Ophthalmol Soc. UK, 1978; 98:348-51.
- 10) Baum JL. Antibiotic use in ophthalmology. In: Duane TD, Jaeger EA, (ed.): Clinical Ophthalmology. Philadelphia, Lippincott JB. 1988; 4:1-25.

- 11) Baum JL, Barza M. Eye infections. In: Pechere JC, (ed.): Infections: Recognition, Understanding and Treatment. Philadelphia, Lea and Febiger, 1989.
- 12) Martínez-Martínez L, Perea EJ. Fundamentos microbiológicos de la terapéutica antimicrobiana. En: Perea EJ, Doyma S.A. (ed.): Enfermedades infecciosas. 1991; 12:199-226.
- 13) Castanera de Molina J. Tratamiento de las úlceras corneales bacterianas. En: Asociación Catalana de Oftalmología. JIMS (ed.): Infecciones oculares. 1987; 11:127-38.
- 14) Gittinger JW Jr. Enfermedades del ojo. En: Wyngaarden & Smith. Interamericana, S.A. (ed.): Cecil, Tratado de Medicina Interna. 18ª ed. México, 1991; 2(524):2540-1.
- 15) Baker AS, Paton B, Haaf J. Ocular Infections: Clinical and Laboratory Considerations. Clin Microb Newsletter 1989; 11(13): 97-101.
- 16) Grayson M. Queratitis. En: Panamericana S.A. (ed.): Enfermedades de la córnea. 2ª ed. 1985; 4: 49-103.
- 17) Hyndiuk RA, Nassif KF, Burd EM. Bacterial diseases. In: Smolin G, Thoft RA. (ed.): The cornea, scientific foundations and clinical practice. Little Brown and Co, Boston, 1983; 5.
- 18) Jones DB. Strategy for the initial management of suspected microbial keratitis. In: Symposium on medical and surgical diseases of the cornea. Transactions of the New Orleans Academy of Ophthalmology. The CV Mosby Co, St Louis, 1980; 5.
- 19) Liesegang TJ, Forster RK. Spectrum of microbial keratitis in South Florida. Am J Ophthalmol 1980; 90:38-47.

- 20) Okumoto M. Infectious agents: Bacteria. In: Smolin G, Thoft RA. (ed.): The cornea, scientific foundations and clinical practice. Little Brown and Co, Boston, 1983; 4.
- 21) Wilson LA. Bacterial corneal ulcers. In: Duane TD. (ed.): Clinical Ophthalmology. Harper & Row, Hagerstown, Md., 1978; 4 (18).
- 22) Bonafonte S, Muiños A, Martínez OM. Esquemas clínico-visuales en oftalmología. 2ª ed. Doyma S.A. (ed.), 1992; 20: 60.
- 23) Ostler H, Dawson CR, Okumoto M. Atlas a color de infecciones e inflamaciones oculares externas. Edika-Med S.A. (ed.), 1988; 4:66-102.
- 24) Jones DB. Decision-making in the management of microbial keratitis. *Ophthalmology*, 1981; 88:814.
- 25) Thygeson P, Okumoto M. Keratomycosis, a preventable disease. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1974; 78:433-9.
- 26) Marines HM, Osato MS, Font RL. The Calcofluor white in the diagnosis of mycotic and acanthamoeba infections of the eye and ocular adnexa. *Ophthalmology* 1987; 94:23-6.
- 27) Samples JR, Binder PS, Luibel FS, Font RL, Visvesvara GS, Peter CR. Acanthamoeba keratitis possibly acquired from a hot tub. *Arch Ophthalmol* 1984; 102:707-10.
- 28) Johns KJ, *et al.* Isolation and Identification of Acanthamoeba in Corneal Tissue. Contact Lens Association of Ophthalmologists, 1987;. 13:272-6.

- 
- 29) Selinger DS, Selinger RC, Redd WP. Resistance to infection of the external eye: the role of tears. *Surv Ophthalmol* 1979; 24:33-8.
  - 30) Baker AS, Schein OD. Ocular infections. In: Bisno A, Waldvogel F. (ed.): *Infections Associated with Indwelling Medical Devices*. Am Soc Microb 1989.
  - 31) Fernandez-Vigo Lopez J, Rafart Arumí JM, Cuevas J, Alvarez S. Queratitis bacterianas, estudio experimental. *Arch Soc Esp Oftal* 1983; 45:155-64.
  - 32) Allen HF. Current status of prevention, diagnosis and management of bacterial corneal ulcers. *Ann Ophthalmol* 1971; 3:235.
  - 33) Allen JC. *Infection and the compromised hosts*. The Williams & Wilkins Co Baltimore, 1976.
  - 34) Ostler HB, Okumoto M. Anaerobic streptococcal corneal ulcer. *Am J Ophthalmol* 1976; 81:518.
  - 35) Alfonso E, *et al*. Ulcerative keratitis associated with contact lens wear. *Am J Ophthalmol* 1986; 101:427-33.
  - 36) Mondino BJ. Corneal ulcers associated with daily wear and extended wear contact lenses. *Am J Ophthalmol* 1986; 102:58-65.
  - 37) Golden B, Fingerman L, Allen HF. *Pseudomonas* corneal ulcers in contact lens wearers: epidemiology and treatment. *Arch Ophthalmol* 1971; 85:543.
  - 38) Stern CA, Zam AS. The Pathogenesis of contact lens associated *Pseudomonas aeruginosa* corneal ulceration: I. the effect of contact lens coatings on adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to soft contact lenses. *Cornea* 1986; 5:41-5.

- 
- 39) Meisler DM, Friedlaender MH, Okumoto M. *Mycobacterium chelonae* keratitis. Am J Ophthalmol 1982; 94:398-401.
- 40) Newman PE, Goodman RA, Waring GO. III, Finton RJ, Wilson LA, Wright J, *et al.* A cluster of cases of *Mycobacterium chelonae* keratitis associated with outpatient office procedures. Am J Ophthalmol 1984;. 97:344-8.
- 41) Prier JE. Opportunistic pathogens. University Park Press. Baltimore, 1974.
- 42) España-Fierro JB. Infecciones en heridas penetrantes oculares. En: Asociación Catalana de Oftalmología. JIMS (ed.): Infecciones oculares. 1987; 17:181-203.
- 43) O'Day DM, Smith RS, Gregg CR, Tuurnbull PCB, Head WS, Ives JA, *et al.* The problem of *Bacillus* species infection with special emphasis on the virulence of *Bacillus cereus*. Ophthalmology, 1981; 88:833.
- 44) Jones DB. Early diagnosis and therapy of bacterial corneal ulcers. Int Ophthalmol Clin 1973; 13:1.
- 45) Jones DB. A plan for antimicrobial therapy in bacterial keratitis. Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol 1975; 79:95.
- 46) Nicoletti G, Nicolosi VM. Diccionario de bacteriología humana. Doyma S.A. (ed.) 1989.
- 47) Okumoto M, Smolin G. Pneumococcal infections of the eye. Am J Ophthalmol 1974; 77:346.
- 48) Valenton MJ, Okumoto M. Toxin producing strains of *Staphylococcus epidermidis*. Arch Ophthalmol 1973; 89:186-9.

- 49) Vaughan DG. Contamination of fluorescein solutions. *Am J Ophthalmol* 1955; 39:55.
- 50) Wilson LA, Ahearn DC. *Pseudomonas* induced corneal ulcers associated with contaminated eye mascara. *Am J Ophthalmol* 1977; 84:112.
- 51) Hutton WL, Sexton RR. Atypical *Pseudomonas* corneal ulcers in semicomatose patients. *Am J Ophthalmol* 1972; 73:37.
- 52) Fedukowicz H, Horwich H. The Gram-negative *diplobacillus* in hypopyon keratitis. *Arch Ophthalmol* 1953; 49:202-5.
- 53) Okumoto M, Smolin G, Belfort A, Kim HB Jr., Siverio CE. *Proteus* species isolated from human eyes. *Am J Ophthalmol* 1976; 81:495.
- 54) Kreger AS, Griffin QK. Cornea damaging proteases of *Serratia marcescens*. *Invest Ophthalmol* 1975; 14:190.
- 55) Herman PE. General principles of antimicrobial therapy. *Mayo Clin Proc* 1977; 52:603.
- 56) Kimura SJ, Thygeson P. The cytology of external ocular disease. *Am J Ophthalmol* 1955; 39:127.
- 57) Ribas Sala J. Antibióticos en oftalmología En: Asociación Catalana de Oftalmología. JIMS (ed.):Infecciones oculares. 1987; 3:41-54.
- 58) Mascaró Ballester F, Castillo R. Profilaxis en cirugía ocular. En: Asociación Catalana de Oftalmología. JIMS (ed.): Infecciones oculares. 1987; 5:65-75.

- 59) Jones DB, Robinson NM. Anaerobic ocular infections. *Trans Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1977; 83:309.
- 60) Sandford JP. Guía de terapéutica antimicrobiana. Díaz de Santos, S.A. (ed). Madrid, 1993.
- 61) Barza M, Kane A, Baum J. Regional differences in ocular concentration of gentamicin after subconjunctival and retrobulbar injection in the rabbit. *Am J Ophthalmol* 1977; 83:407-14.
- 62) Janknegt R. Fluorinated quinolones: a review of their mode of action, antimicrobial activity, pharmacokinetics and clinical efficacy. *Pharmaceutisch Weekblad. Scientific Edition*, 1986; 8:795-800.
- 63) Smith JT. Chemistry and mode of action of 4-quinolone agents. *Fortsch Antimikrob Chemother* 1984; 3:493-508.
- 64) Higgins NP, Peebles CL, Sugino A, Cozzarelli NR. Purification of subunits of *E. coli* DNA gyrase and reconstitution of enzymatic activity. *Proc National Acad Sci (USA)*, 1978; 75:1773-7.
- 65) Cozzarelli NR. DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science* 1980; 207:953-60.
- 66) Smith JT. Awakening the slumbering potential of the 4-quinolone antibacterials. *Pharm J* 1984; 15 Sept: 299-305.
- 67) Smith JT. The mode of action of the quinolone antibacterials. *Infection* 1986; 14 Suppl 1:3-15.
- 68) Wang JC. DNA topoisomerases. *Ann Rev Biochem* 1985; 54:665-97.

- 
- 69) Shen LL, Pernet A. Mechanism of inhibition of DNA gyrase by analogs of nalidixic acid: the target of the drug is DNA. *Proc National Acad Sci (USA)*, 1985; 82:307-11.
- 70) Van Landuyt HW, Rummens JL, Boelaert J, Lambert AM. *In vitro* activity of ofloxacin compared with six other quinolones and five beta-lactams. 24th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington DC, 1984; P:26-30. Excerpta Medica, Tokyo, 1985.
- 71) Bauernfeind A, Ullmann U. *In vitro* activity of enoxacin, ofloxacin, norfloxacin and nalidixic acid. *J Antimicrob Chemother* 1984; 14 Suppl C:33-7.
- 72) Davies BI, Maesen FPV, Teengs JP, Baur C. The quinolones in chronic bronchitis. *Pharmaceutisch Weekblad. Scientific Edition*, 1986; 8:53-9.
- 73) Wall RA, Mabey DCW, Bello CSS, Felmingham D. The comparative *in vitro* activity of twelve 4-quinolone antimicrobials against *Haemophilus ducreyi*. *J Antimicrob Chemother* 1985; 16:165-8.
- 74) Scribner R, Weber A, Marks MI. *In vitro* activity of ofloxacin against bacterial isolates from pediatric patient. 24th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington DC, 1984; P 14-21. Excerpta Medica, Tokyo, 1985.
- 75) O'Hare MD, Felmingham D, Ridgway GL, Grüneberg RN. The comparative *in vitro* activity of twelve 4-quinolone antimicrobials against enteric pathogens. *Drugs Under Experimental and Clinical Research*, 1985; 11:253-7.
- 76) Auckenthaler R, Michéa-Hamzehpour M, Pechère JC. *In vitro* activity of newer quinolones against aerobic bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1986; 17 Supl B:29-39.

- 
- 77) Goosens H, De Mol P, Coignau H, Levy J, Grados O, *et al.* Comparative *in vitro* activities of aztreonam, ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, HR 810 (a new cephalosporin), RU 28965 (a new macrolide) and other agents against Enteropathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 27:388-92.
- 78) Van der Auwera P, Scoreneaux B. *In vitro* susceptibility of *Campylobacter jejuni* to 27 antimicrobial agents and various combinations of  $\beta$ -lactams with clavulanic acid or sulbactam. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28:37-40.
- 79) Greenwodd D, Laverick A. Activities of newer quinolones against legionella group organisms. *Lancet* 1983; 2:279-80.
- 80) Saito A, Sawatari K, Fukuda Y, Nagasawa M, Koga H, *et al.* Susceptibility of *Legionella pneumophila* to ofloxacin *in vitro* and experimental *Legionella* pneumonia in guinea pigs *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28:15-20.
- 81) Robbins MJ, O'Hare MD, Felmingham D, Ridgway GL, Grüneberg RN. The comparative activity of twelve 4-quinolone antimicrobials against Gram-positive and Gram-negative anaerobes. *Drugs Under Experimental and Clinical Research*, 1985; 11:431-4.
- 82) Cullmann W, Stieglitz M, Baars B, Opferkuch W. Comparative evaluation of recently developed quinolone compounds -with a note on the frequency of resistant mutants. *Chemotherapy*. Basel, 1985; 31:19-28.
- 83) Roosbroeck van RJ, Privinciael DR, Caekenberghe van DL. Activity of the newer quinolones against *Chlamydia trachomatis*. *Br J Vener Dis* 1984; 60:350.
- 84) Fenlon CH, Cynamon MH. Comparative *in vitro* activity of ciprofloxacin and other 4-quinolones against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium intracellulare*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 29:386-8.

- 
- 85) Suzuyama Y, Hara K, Yamaguchi K, Kohno S, Shigeno Y. *In vitro* antituberculosis activity of ofloxacin and its clinical effect on pulmonary tuberculosis. Abstract 45, 26th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, New Orleans, 1986.
- 86) Tsukamura M. *In vitro* antituberculosis activity of a new antibacterial substance ofloxacin (DL 8280). *Am Rev Resp Dis* 1985; 131:348-51.
- 87) Aznar J, Caballero MC, Lozano MC, de Miguel C, Palomares JC, *et al.* Activities of new quinolones derivatives against genital pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 27:76-8.
- 88) King A, Shannon K, Phillips I. The *in vitro* activities of enoxacin and ofloxacin compared with that of ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother* 1985; 15:551-8.
- 89) Felmingham D, O'Hare MD, Robbins MJ, Wall RA, Williams AH, *et al.* Comparative *in vitro* studies with 4-quinolone antimicrobials. *Drugs Under Experimental and Clinical Research* 1985; 11:317-29.
- 90) Grüneberg RN, *et al.* The comparative *in vitro* activity of ofloxacin. *J Antimicrob Chemother* 1988; 22 (supl C):9-19.
- 91) Seibert G, Klesel N, Limbert M, Schrinner E, Winkler I. *In vitro* antibacterial activity of ofloxacin compared with other antimicrobial agents in ampicillin-resistant clinical isolates. *Arzneimittel-Forschung* 1984; 34:1552-4.
- 92) Andriole VT. Quinolones. In: Mandell GL, Douglas RG Jr, Bennett JE (ed.): *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 3<sup>a</sup> ed. Churchill Livingstone, Inc New York, 1990; :334-45.

- 
- 93) Sato K, Inoue Y, Fujii T, Aoyama H, Inoue M, *et al.* Purification and properties of DNA gyrase from a fluoroquinolone-resistant strain of *E. coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 30:777-80.
- 94) Yamagishi J, Yoshida H, Yamayoshi M, Nakamura S. Nalidixic acid resistant mutations of the *gyr B* gene of *E. coli*. *Molecular and General Genetics* 1986; 204:367-73.
- 95) Michéa-Hamzehpour M, Auckenthaler R, Regamey P, Pechère JC. Resistance occurring after fluoroquinolone therapy of experimental *Pseudomonas aeruginosa* peritonitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31 (11):1803-8.
- 96) Fernandez PB, Hanson CW, Stamm JM, Voitko C, Shipkowitz NL, St. Martín E. The frequency of *in vitro* resistance development to fluoroquinolones and the use of a murine pyelonephritis model to demonstrate selection of resistance *in vivo*. *J Antimicrob Chemother* 1987; 19 (4):449-65.
- 97) Limb DI, Dabbs DJ, Spencer RC. *In vitro* selection of bacteria resistant to the 4-quinolone agents. *J Antimicrob Chemother* 1987; 19 (1):65-71.
- 98) Bauernfeind A, Petermüller C, Danninger J. Selection of mutants with increased minimal inhibitory concentrations by pefloxacin, ofloxacin, norfloxacin and ciprofloxacin in *P. aeruginosa*. 24th Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington DC, 1984; P:36-44. Excerpta Medica, Tokyo, 1985
- 99) Campos P, Vera A, Martín Luengo F. Isolation of mutants of *P. aeruginosa* PAOI resistant to ciprofloxacin, norfloxacin and ofloxacin and incomplete cross-resistance with nalidixic acid. Abstract 14th International Congress of Chemotherapy, Kyoto, 1985.

- 100) Neu HC. Bacterial resistance to fluorquinolones. *Rev Infect Dis* 1988; 10 (1):57-63.
- 101) Wolfson JS, Hooper DC. Bacterial resistance to quinolones: mechanisms and clinical importance. *Rev Infect Dis* 1989; 11 (5):960-8.
- 102) Shalit I, *et al.* Widespread quinolone resistance among methicillin-resistant *S.aureus* isolates in a general hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33:593-4.
- 103) Bron A, Talon D, Delbosc B, Estaboyer JM, Kaya G, Royer J, *et al.* La pénétration intracaméculaire de l'Ofloxacin chez l'homme. *J Fr Ophthalmol* 1987; 10:443-6.
- 104) Bron A, Talon D, Estaboyer JM, Delbosc B, Montard M, Royer J. Les progrès du traitement médical des endophtalmies bactériennes. *Ophtalmologie* 1989; 3:73-6.
- 105) Oishi M, Sakaue B, Oomomo A, Tazawa H. Investigation of new quinolones in the field of ophthalmology. Proceedings of 15th Int.Congr Chemother, Estambul. Progress in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy, Antimicrobial. Jul 1987; 2:1865-7.
- 106) Kanellas D, Petrikos G, Giamarellou H, Kavouklis E, Chryssoulis and Gabrilel L. Comparative humor kinetics of ciprofloxacin, ofloxacin and pefloxacin into the human eye. Abstracts 3rd Int Symposium on new quinolones. Vancouver, Jul 1990; 475.
- 107) Barza M. Treatment of bacterial infections of the eye. In: Remington JR, Swartz MN, (ed.): *Current Clinical Topics in Infectious Diseases*. McGraw-Hill Book Company. New York, 1980; 158-94.
- 108) Ooishi M, Nagai S. Fundamental and clinical studies of DL-8280 in ophthalmology. *Chemotherapy* 1984; 32 (1):1050-5.

- 109) Tokuda H, Arimoto K, Shimizu C. The clinical experiment of DL-8280 in external eye diseases and the penetration into the tear of human eyes. *Chemotherapy* 1984; 32 (1):1056-8.
- 110) Sato K, Matsuura Y, Inoue M, Une T, Osada T, Ogawa H, *et al.* *In vitro* and *in vivo* activity of DL-8280, a new oxazine derivate. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 22:548-53.
- 111) Oishi M, Nishizuka K, Motoyama M, Ogawa T. Fundamental and clinical studies on Pipemidic acid in ophthalmological field. *Chemotherapy* 1975; 23:2969-73.
- 112) Oishi M, Hayashi H, Shuta S. Ophthalmological application of Nalidixic acid (Wintomylon). *Chemotherapy* 1966; 14:19-23.
- 113) Yamada A, Nakamura S, Tkahashi K, Sawada M, Okada S. Post marketing surveillance of ofloxacin in Japan. Abstracts 2nd Int Symposium on new quinolones. Genova, Aug 1988.
- 114) Richman J, Zolezio H, Tang-Liu D. Tear concentrations of ofloxacin, gentamicin and tobramycin in rabbits *vs.* *in vitro* MIC values. ARVO Abstracts. Supplement to Invest Ophthalmolo Vis Sci 1989; 30 (3):199.
- 115) Osato MS, Hensen HG, Trousdale MD, Bosso JA, Borrmann LR, Frank J, *et al.* The comparative *in vitro* activity of ofloxacin and selected ophthalmic antimicrobial agents against ocular bacterial isolates. *Am J Ophtalmol* 1989; 108:380-6.
- 116) Borrmann L, Tang-Liu D, Kann J, Nista J, Frank J, Akers P. Tears levels and systemic absorption of ofloxacin eyedrops in humans. ARVO Abstracts. Supplement to Invest Ophthalmol Vis Sci 1989; 30 (3):247.

- 117) Casal M, Gutiérrez J, González J, Ruiz P. *In vitro* susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to ofloxacin and ciprofloxacin in combination with rifampin and isoniazid. *Chemotherapy* 1987; 6:437-9.
- 118) Neu HC, Chin NX, Labthavikul P. Antibacterial activity of coumermycin alone and in combination with other antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 25: 687-9.
- 119) Scribner RK, Muszynski MJ, Marks MI. *In vitro* activity of antimicrobials, alone and in combination, against *P. cepacia*. Abstract 394, 24th Interscience Conference on Antimicrob Agents Chemother, Washington DC, 1984.
- 120) Yamamoto Y, Iso T, Kitano S. Effects of ofloxacin eye drops on rabbit corneal epithelium. A study of scanning electron microscopy. *Folia Ophthalmol Jpn* 1985; 36:2116-9.
- 121) Yamauchi H, Mibo H, *et al.* Safety evaluation of ofloxacin in rabbits I. Ocular irritation tests by topical application for one week *Folia Ophthalmol Jpn*. Citado en: Muro Alvarez A. Bases microbiológicas y experimentales para el tratamiento de infecciones del polo anterior del ojo con ofloxacina. U.C.M., Facultad de Medicina, Departamento de Microbiología, Madrid, 1988.
- 122) Cutler RA, Stenger RJ, Suter CM. New antibacterial agents: 2-acylamino-1-(4-hydrocarbonylsulfonyl)-1,3-propanediols and related compounds. *J Am Chem Soc* 1952; 74:5475
- 123) Walter AM, Heilmeyer L. Chloramphenicol und Thiamphenicol. *Antibiotika-Fibel*, 4e Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (B.R.D.). 1975; 466-72.
- 124) Kawabe K, Yamamoto S, Kanazawa T, *et al.* Basic studies on Thiophenicol, a new Chemotherapeutic. *Chemotherapy* 1967; 14:421-6.

- 125) Florez J, Armijo JA, Mediavilla A. Tetraciclinas y cloranfenicol. En: EUNSA (ed.): *Farmacología Humana*. Pamplona, 1988; 927-33.
- 126) Laplasote J, Brunaud M. Recherches experimentales sur Thiophenicol: activité antibacteriene, concentrations humorales, elimination. Comparaison avec le Cloramphenicol. *Therapie* 1961; 16:101-8.
- 127) Jimenez JJ, Hrimura GK, Abon-Khalil WH, Isildar M, Yunis AA. Choramphenicol induced bone marrow injury: possible role of bacterial metabolites of chloramphenicol. *Blood* 1987; 70:1180-5.
- 128) Contreras A, Barbacid M, Vazquez D. Binding to ribosomes and mode of action of chloramphenicol analogues. *Biochem Biophys, Acta* 349. 1974; 376-88.
- 129) Franklin TJ, Snow GA. *Biochemistry of Antimicrobial Action*. 2nd ed. Chapman and Hall, London, 1971.
- 130) Monro RE, Vázquez D. Ribosome-catalysed peptidyl transfer: effects of some inhibitors of protein synthesis. *J Mo. Biol* 1967; 28:161-5.
- 131) Pratt WB, Fekety R. *The Antimicrobial Drugs*. Oxford University Press, New York, 1986; 205-8.
- 132) Contreras A, Barbacid M, Vazquez D. Aspectos comparativos de la acción del cloramfenicol y tiamfenicol sobre los ribosomas bacterianos. *Symposium Internacional sobre cloramfenicol/tiamfenicol*. Colección Monográfica Zambón. Barcelona, 1973; 124-9.
- 133) Finegold SM, Harada NE, Miller LG. Antibiotics susceptibility patterns as Aids in classification and characterization of gram negative anaerobic bacilli. *J Bacteriol* 1967; 94:1.443-50.

- 134) Duck PD, Dillon JR, Eidns L. Effects of thiamphenicol and CAP in inhibiting *Neisseria gonorrhoeae* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother* 1978; 14:788.
- 135) Ferrari R, Della Bella D. Revisión comparativa del metabolismo del cloramfenicol y el tiamfenicol. *Symposium Internacional sobre cloranfenicol/tianfenicol. Colección Monográfica Zambón. Barcelona, 1973; 21-37.*
- 136) Neumam M. *Farmacología clínica de los antibióticos. Laboratorios Zambón. Mayo, S.A. (ed.). Barcelona, 1990.*
- 137) Aldana I, Fos D, Gonzalez Peñas E, Gazzaniga A, Ganesello V, Monti , *et al.* Ocular Pharmacokinetics of thiamphenicol in rabbits. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 1992; 42 (II) 10:1236-9.
- 138) Zato MA. Aqueous humor concentration of thiamphenicol after the administration of thiamphenicol by I.M. route in patients undergoing surgery for cataracts. *Clinical report. Zambon S.A., Enero 1993.*
- 139) Jawetz E, Gunnison JB, Speck RS. Studies on antibiotic synergism and antagonism: the interference of aureomycin, chloramphenicol and terramycin with the action of streptomycin. *Am J Med Sci* 1951; 222:404-12.
- 140) Sande MA, Overton JW. *In vivo* antagonism between gentamicin and cloramphenicol in neutropenic mice. *J Infect Dis* 1973; 128:247-50.
- 141) Martínez-Dalmau A, Fernández MN, Barbolla L. Toxicidad hematológica del tiamfenicol. *Sangre* 1972; 17:59-60.
- 142) Sensi P, Greco AM, Ballota R. *R Antibiot Ann* 1959/1960; 262. Citado en: Dámaso D. Rifamicinas. En: *Marketing Pharm, S.A., (ed.): Antibacterianos. 1990; 16:407-34.*

- 
- 143) Wehrli W. Rifampicin: mechanisms of action and resistance. *Rev Infect Dis* 1983; 5 (3):407-11.
- 144) Dámaso D. Rifamicinas. En: Marketing Pharm, S.A., (ed.): *Antibacterianos*. 1990; 16:417-34.
- 145) Wilkie J, Smolin G, Okumoto M. The effect of rifampicin on *Pseudomonas* keratitis. *Can J Ophthalmol* 1972; 7:309.
- 146) Puertas Bordallo D, Fernández de Castro Pombo J, Ortiz Blasco JM, Ricoy Campo JR. Tratamiento antibiótico de las infecciones oculares externas. *Arch Soc Esp Oftal* 1984; 47:83-92.
- 147) Sippel JE, Mikhail IA, Girgis NI, Youssef HH. Rifampicin concentrations in cerebrospinal fluid of patients with tuberculous meningitis. *Am Rev Respir Dis* 1974; 109:579-80.
- 148) Rosselot JP, Marquez J, Meseck E, Murawski A, Hamdan A, Joyner C, *et al.* Isolation, purification and characterization of gentamicin. In: Sylvester JC, (ed.): *Antimicrobial Agents and Chemotherapy-1963*, American Society for Microbiology. Ann Arbor, Mich, 1964; 14-16.
- 149) Higgins CE, Kastners RE. Nebramycin, a new broad-spectrum antibiotic complex. II. Description of *Streptomyces tenebrarius*. *Antimicrob Agents Chemother* 1967; 7:324-31.
- 150) Davies BD. The lethal action of aminoglycosides. *J Antimicrob Chemother* 1988; 22:1-3.

- 151) Luzzatto L, Apirion D, Schlessinger D. Polyribosome depletion and blockage of the ribosome cycle by streptomycin in *Escherichia coli*. J Mol Biol 1969; 42:315-35.
- 152) Tai PC, Wallace BJ, Davis BD. Streptomycin causes misreading of natural messenger by interacting with ribosomes after initiation. Proc Natl Acad Sci U.S.A., 1978; 75:275-9.
- 153) Tanaka N. Mechanism of action of aminoglycoside antibiotics. In: Umezawa H, Hooper IR, (ed.): Aminoglycoside antibiotics. Handbook of experimental pharmacology. Berlín, Springer-Verlag, 1982; 221-66.
- 154) Cunha BA. Aminoglycosides: Current role in antimicrobial therapy. Pharmacotherapy 1988; 8:334-50.
- 155) Symposium. (Various authors.) Tobramycin. J Infect Dis 1976; 134.
- 156) Gomez-Lus R. Mecanismo de resistencia a aminoglucósidos y otros antimicrobianos. En: Belmonte A, (ed.): Terapéutica antibiótica. Madrid, 1982; 184-91.
- 157) Gangadharam PRJ, Candler ER, Ramakrishna PV. *In vitro* anti-mycobacterial activity of some new aminoglycoside antibiotics. J Antimicrob Chemother 1977; 3:285-6.
- 158) Wilhelmus KR, Gilbert ML, Osato MS. Tobramycin in Ophthalmology. Surv Ophthalmol 1987; 32 (2):111-22.
- 159) Insler MS, Helm CJ, George WJ. Topical vs systemic gentamicin penetration into the human cornea and aqueous humor. Arch Ophthalmol 1987; 105:922-4.
- 160) Ellerhost B, Golden B, Jarudi N. Ocular penetration of applied gentamicin. Arch Ophthalmol, U.S.A., 1975; 93 (5):371-8.

- 
- 161) Furgiuele FP. Ocular penetration and tolerance of gentamicin. *Amer J Ophthal* 1967; 64:421-6.
- 162) Hillman JS, Jacobs S, Garnett AJ, Kheskani MB. Gentamicin penetration and decay in the human aqueous. *Brit J Ophthal* 1979; 63:794-6.
- 163) Matoba AY, Wilhelmus KR, Robinson NM, *et al.* Concentration of tobramycin in preocular tear film following topical application. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982; 22:215.
- 164) Oishi M, Nakatsue T, Takizawa H, *et al.* Ophthalmic use of tobramycin. *Chemotherapy*, Tokyo, 1975; 23:1432-9.
- 165) Oishi M, Nishizuka K, Motoyama M, *et al.* Studies of tobramycin eye drops. Report 2. Intraocular penetration. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, 1977; 81:1777-82.
- 166) Woo FL, Johnson AP, Insler MS, *et al.* Gentamicin, tobramycin, amikacin, and netilmicin levels in tears following intravenous administration. *Arch Ophthalmol* 1985; 103:216-8.
- 167) Kupferman A, Leibowitz HM. Topical antibiotic therapy of *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. *Arch Ophthalmol* 1979; 97:1699-1702.
- 168) Waitz JA, Weinstein MJ. Recent microbiological studies with gentamicin. *J Infect Dis* 1969; 119:355-60.
- 169) Oishi M, Nishizuka K, Motoyama M, *et al.* Studies of tobramycin eye drops. Report 1. Ocular disturbance. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, 1977; 81:1769-76.

- 
- 170) Dukes MNG. *Meyler's side effects of drugs*. 11 th ed. Elsevier, Amsterdam, 1988; 993.
- 171) Stern GA, Schemmer GB, Farber RD, *et al*. Effect of topical antibiotic solutions on corneal epithelial wound healing. *Arch Ophthalmol* 1983; 101:644-7.
- 172) Moellering RC, Korzeniowski OM, Sande MA, Wennersten CB. Species-specific resistance to antimicrobial synergism among enterococci. *J Infect Dis* 1979; 140:203-8.
- 173) Bigger JW. The bactericidal action of penicillin on *Staphylococcus pyogenes*. *Ir J Med Sci* 1944; 227:533-68.
- 174) Parker RF, Marsh C. The action of penicillin on *Staphylococcus*. *J Bacteriol* 1946; 41:181-6.
- 175) Parker RF, Luse S. The action of penicillin on *Staphylococcus*: further observations on the effect of a short exposure. *J Bacteriol* 1948; 56:75-81.
- 176) Eagle H, Fleischman R, Musselman AD. The effective concentrations of penicillin *in vitro* and *in vivo* for *streptococci*, *pneumococci* and *treponema pallidum*. *J Bacteriol* 1950; 59:625-43.
- 177) Eagle H, Fleischman R, Musselman AD. The bactericidal action of penicillin *in vivo*: the participation on the host, and the slow recovery of the surviving organisms. *An Intern Med* 1950; 33:544-71.
- 178) Eagle H, Fleischman R, Levy M. Continuous *versus* "discontinuous" therapy with penicillin. The effect of the interval between injections on therapeutic efficacy. *N Engl J Med* 1953; 248:481-8.

- 179) Bodey GP, Pan T. Effect of cephalothin on growth patterns of microorganisms. *J Antibiot* 1976; 29:1092-95.
- 180) Wilson DA, Rolinson GN. The recovery period following exposure bacteria to penicillins. *Chemotherapy* 1979; 25:14-22.
- 181) Craig WA, Gudmundsson S. The postantibiotic effect. In: Lorian V (ed.): *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 3nd. The Williams & Wilkins Co, Baltimore, 1991; 403-31.
- 182) Bundtzen RW, Gerber AU, Cohn DI, Craig WA. Postantibiotic suppression of bacterial growth. *Rev Infect Dis* 1981; 3:28-37.
- 183) Renneberg J, Walder M. Postantibiotic effects of imipenem, norfloxacin, and amikacin *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33 (10):1714-20.
- 184) MacKenzie FM, Gould IM. The postantibiotic effect. *J Antimicrob Chemother* 1993; 32:519-37.
- 185) Weisblum B, Davies J. Antibiotic inhibitors of the bacterial ribosome. *Bacteriol Rev* 1968; 32:493-528.
- 186) Gerber A. Postantibiotic effect: an update and an outlook on clinical relevance. *Current Op Infect Dis* 1993; 6:751-7.
- 187) Gerber AU, Craig WA. Growth kinetics of respiratory pathogens after short exposures to ampicillin and erythromycin *in vitro*. *J Antimicrob Chemother* 1981; 8 (C):581-91.
- 188) Spratt BG. The mechanism of action of penicillin. *Sci Prog* 1978; 65:101-28.

- 189) Fuad N, Frère TM, Ghuyse TM, Duez C, Iwatsubo M. Mode of interaction between betalactam antibiotics and the exocellular DD-carboxypeptidase-transpeptidase from *Streptomyces* R39. *Biochem J* 1976; 155:623-9.
- 190) Tamura T, Imae Y, Strominger JL. Purification to homogeneity and properties of two D-alanine carboxypeptidases I from *E. coli*. *J Biol Chem* 1976; 251:414-23.
- 191) Tomasz A. From penicillin-binding proteins in the lysis and death of bacteria: a 1979 view. *Rev Infect Dis* 1979; 1:434-67.
- 192) Georgopapadakou NH, Kiu FY. Penicillin-binding proteins in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 18:148-57.
- 193) Baquero F, Culebras E, Patrón C, Pérez-Díaz JC, Medrano JC, Vicente MF. Postantibiotic effect of imipenem on Gram-positive and Gram-negative microorganisms. *J Antimicrob Chemother* 1986; 18 Suppl E:47-59.
- 194) Bustamante CI, Drusano GL, Tatem BA, Standiford HC. Postantibiotic effect of imipenem on *P. aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 26 (5):678-82.
- 195) Manek N, Andrews JM, Wise R. The postantibiotic effect of imipenem. *J Antimicrob Chemother* 1986; 18:641-9.
- 196) Borgers M. Mechanism of action of antifungal drugs with especial references to the imidazole derivatives. *Rev Infect Dis* 1980; 2:520-34.
- 197) De Nollin S, Van Belle H, Goosens F, Thone F, Borgers M. Cytochemical and biochemical studies of yeast after *in vitro* exposure to miconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 1977; 11:500-13.

- 
- 198) Uno A, Shigematsu I, Avai T. Primary site of action of ketoconazole on *Candida albicans*. Antimicrob Agent Chemother 1982; 21:912-8.
- 199) Lorian V, Ernst J, Amaral L. The postantibiotic effect defined by bacterial morphology. J Antimicrob Chemother 1989; 23:485-91.
- 200) Mattie H. Kinetics of antimicrobial action. Rev Infect Dis 1981; 3:19-27.
- 201) Hanberger H, Nilsson LE, Kihlström E, Maller R. Postantibiotic effect of betalactam antibiotics on *E. coli* evaluated by bioluminescence assay of bacterial ATP. Antimicrob Agents Chemother 1990; 33 (1):102-6.
- 202) Isaksson B, Nilsson L, Maller R, Sörén L. Postantibiotic effect of aminoglycosides on Gram-negative bacteria evaluated by a new method. J Antimicrob Chemother 1988; 22:23-33
- 203) Rescott D, Nix DE, Holden P, Schentag JJ. Comparison of two methods for determining *in vitro* postantibiotic effects of three antibiotics on *E. coli*. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32 (4):450-3.
- 204) Shah PM, Huebner KG, Stille W. *In vitro* untersuchungen zur intermittierenden therapie mit penicillin G und ampicilin. Med Welt 1978; 29:888-92.
- 205) Gould IM, Jason AC, Milne K. Use of the Malthus Microbial Growth Analyser to study the postantibiotic effect of antibiotics. J Antimicrob Chemother 1989; 24:523-31.
- 206) Gottfredsson M, Erlendsdóttir H, Gudmundsson S. Quantitation of postantibiotic effect by measuring CO<sub>2</sub> generation of bacteria with the BACTEC blood culture system. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35 (12):2658-61.

- 
- 207) Gottfredsson M, Erlendsdóttir H, Kolka R, Gudmundsson S. Metabolic and ultrastructural effects induced by ciprofloxacin in *S. aureus* during the postantibiotic effect (PAE) phase. *Scand J Infect Dis* 1991; 74:124-8.
- 208) Odenholt I, Holm SE, Cars O. Effects of benzylpenicillin on *S. pyogenes* during the postantibiotic phase *in vitro*. *J Antimicrob Chemother* 1989; 24:147-56.
- 209) Chin NX, Neu HC. Postantibiotic suppressive effect of ciprofloxacin against gram-positive and gram-negative bacteria. *American J Med* 1987; 82 Suppl 4A:58-61.
- 210) Smith SM, Eng RHK, Berman E. The effect of ciprofloxacin on methicillin-resistant *S. aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1986; 17:287-95.
- 211) Bergan T, Carlsen IB, Fuglesang JE. An *in vitro* model for monitoring bacterial responses to antibiotic agents under simulated *in vivo* conditions. *Infection* 1980; 8:96-102.
- 212) Bergan T, Carlsen IB. Bacterial kill rates of amoxycillin and ampicillin at exponentially diminishing concentrations simulating *in vivo* conditions. *Infection* 1980; 8:103-8.
- 213) Gerber AU, Wiprächtiger P, Stettler-Spichiger U, Lebek G. Constant infusions versus intermittent doses of gentamicin against *P. aeruginosa in vitro*. *J Infect Dis* 1982; 145:554-60.
- 214) Grasso S, Meinardi G, De Carmen I, Tamassia V. New *in vitro* model to study the effect of antibiotic concentration and rate of elimination on antibacterial activity. *Antimicrob Agents Chemother* 1978; 13:570-6.

- 215) Miller AK, Wilmer DI, Verwey WF. Effect of penicillin dosage schedule on treatment of experimental typhoid infections in mice. *Proc Sci Exp Biol Med* 1950; 4:62-4.
- 216) Nishida M, Murakawa T, Kaimura T, Okada N. Bactericidal activity of cephalosporins in an *in vitro* model simulating serum levels. *Antimicrob Agents Chemother* 1978; 14:6-12.
- 217) Sanfilippo A, Schioppacassi G. New approach to the evaluation of antibacterial activity of aminosidine. *Chemotherapy*, 1973; 18:297-303.
- 218) Shah PM. Bactericidal activity of ampicillin and amoxicillin. *J Antimicrob Chemother* 1981; 8:93-9.
- 219) Kagan JP, Zinner SH, Keating MH, Moon-McDermott L, Peter G. *In vitro* continuous and bolus infusions of new betalactams and gentamicin against *K. pneumoniae*, using a capillary model. In Program and Abstracts of the 22th Int Conf Antimicrob Agents Chemother, Abstract 384. Am Soc Microbiology. Washington DC, 1982; 133.
- 220) Toothaker RD, Welling PG, Craig WA. An *in vitro* model for the study of antibacterial dosage regimen design. *J Pharm Sci* 1982; 71:861-4.
- 221) Zinner SH, Husson M, Klastersky J. An artificial capillary *in vitro* kinetic model of antibiotic bactericidal activity. *J Infect Dis* 1981; 144:583-7.
- 222) Craig WA, Turnidge JD, Gudmundsson S. *In vivo* demonstration of postantibiotic effect (PAE). In Program and Abstract of the 22th Int Conf Antimicrob Agents Chemother, Abstract 634. Am Soc Microbiology. Washington DC, 1982; 78.

- 
- 223) Craig WA. The time course of antibacterial effects of aminoglycosides. In: Spitzky KH, Karrer K, Egermann VH. (ed.): Proceeding of 13th Int Congr Chemother. Viena, 1983; (Part 35):4-8.
- 224) Craig WA. Pharmacokinetic and experimental data on betalactam antibiotics in the treatment of patients. Eur J Clin Microbiol 1984; 3:575-8.
- 225) Gudmundsson S, Turnidge J, Vogelman B, Craig WA. The post antibiotic effect *in vivo*. In: Spitzky KH, Karrer K, Egermann VH. (ed.): Proceeding of 13th Int Congr Chemother. Viena, 1983; (Part 117): 68-71.
- 226) Hunter PA, Rolinson GN, Witting DA. Comparative activity of amoxycillin and ampicillin in an experimental bacterial infection in mice. Antimicrob Agents Chemother 1973; 4:285-93.
- 227) Rolinson GN. Plasma concentrations of penicillin in relation to the antibacterial effect. In: Davies DS, Prichard BNC. (ed.): Biological Effects of Drugs in Relation to their Plasma Concentrations. University Park Press. Baltimore, 1973; 183-9.
- 228) Sande MA, Korzeniowski OM, Allegro GM, Brennan RO, Zak O, and Scheld WM. Intermittent or continuous therapy of experimental meningitis due to *S. pneumoniae* in rabbits: preliminary observations on the postantibiotic effect *in vivo*. Rev Infect Dis 1981; 3:98-109.
- 229) Tauber MG, Zak O, Scheld WM, Hengstler B, Sande MA. The post antibiotic effect in the treatment of experimental meningitis caused by *S. pneumoniae* in rabbits. J Infect Dis 1984; 149:575-84.
- 230) Drake TA, Scheld WM, Sande MA. Effects of subbactericidal concentrations of antibiotics in experimental endocarditis. J Antimicrob Chemother 1985; 15 Suppl A:293-6.

- 231) Ingerman MJ, Pitsakis PG, Rosenberg AF, Levison ME. The importance of pharmacodynamics in determining the dosing interval in therapy for experimental *Pseudomonas* endocarditis in the rat. *J Infect Dis* 1986; 163:707-14.
- 232) Hessen MT, Psitakis PG, Levison ME. Absence of a postantibiotic effect in experimental *Pseudomonas* endocarditis treated with imipenem, with or without gentamicin. *J Infect Dis* 1988; 158:542-8.
- 233) Hessen MT, Psitakis PG, Levison ME. Absence of a postantibiotic effect in experimental left-side *S. faecalis* endocarditis treated with penicillin *plus* gentamicin. In: Gillissen G, Opferkuch W, Peters G, Pulverer G. (ed.): *The influence of antibiotics on the host-parasite III*. Springer-Verlag, Berlín, Heidelberg, 1989; 222-5.
- 234) Blaser J, Lüthy R. Comparative study on antagonistic effect of low pH and cation supplementation on *in vitro* activity of quinolones and aminoglycosides against *P. aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1988; 22:15-22.
- 235) Gudmundsson A, Erlendsdottir H, Gottfredsson M, Gudmundsson S. Impact of pH and cationic supplementation on *in vitro* postantibiotic effect. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35 (12):2617-24.
- 236) Mínguez F, Aparicio P, Lurueña S, Cabronero MJ, Prieto J. Influencia de las asociaciones bacterianas sobre el efecto postantibiótico. *Enf Infec Microb Clin* 1990; 8 (4):30-4.
- 237) Mínguez F, Ramos C, Barrientos S, Lurueña S, Loscos A. Influencia de diversos factores sobre el efecto postantibiótico y la actividad antimicrobiana de ciprofloxacino. *Rev Esp Quimioterap* 1990; 3 (3):229-34.

- 238) Minguez F, Gómez-Lus ML, Ballesteros S, Prieto J. Influence of pH on the Postantibiotic effect (PAE) of netilmicin against *S. aureus* and *E. coli*. J Chemother 1989; Suppl 4:181-3.
- 239) McDonald PJ, Pruu H, Wetherall B. Susceptibility of antibiotic-damaged bacteria to leukocytes. In: Spitzky KH, Karrer K, Egermann VH. (ed.): Proceeding of 13th Int Congr Chemother, Viena, 1983; (Part 53):2-5.
- 240) Pruu H, McDonald PJ. Enhancement of leukocyte activity against *E. coli* after brief exposure to chloramphenicol. Antimicrob Agents Chemother 1979; 16:695-700.
- 241) Pruu H, Weterall BL, McDonald PJ. Enhanced susceptibility of *E. coli* to intracellular killing by human polymorphonuclear leukocytes after *in vitro* incubation with chloramphenicol. Antimicrob Agents Chemother 1981; 19:945-51.
- 242) Eagle H. The recovery of bacteria from the toxic effects of penicillin. J Clin Invest 1949; 28:832-6.
- 243) Vogelmann B, Gudmundsson S, Craig WA. Reduced susceptibility of bacteria during the postantibiotic (PAE) to bactericidal antimicrobials. In: Program and Abstracts of the 23th Int Conf Antimicrob Agents Chemother, Am Soc Microb, Washington DC, 1983; Abstract 895. 249.
- 244) Baum JL. Treatment of bacterial ulcers of the cornea in the rabbit: a comparison of administration by eye drops and subconjunctival injections. Trans Am Ophthalmol Soc 1982; 80:369-90.
- 245) Gimbert Roura J, Gimbert Rafols J. Penetración intraocular de los medicamentos. Arch Soc Esp Ofta. 1982; 42 (1):53-61.

- 246) Langham M. Factors affecting the penetration of antibiotics into the aqueous humor. *Br J Ophthalmol* 1951; 35:614-20.
- 247) Tuda Gonzalo D, González Martínez de Zárate JL. Penetración intraocular de la gentamicina mediante su aplicación tópica. *Arch Soc Esp Oftal* 1984; 46:439-44.
- 248) Black J, Calesnick B, Williams D, *et al.* Pharmacology of gentamicin a new broad-spectrum antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother* 1963; 64:138-47.
- 249) Barza M. Antibacterial agents in the treatment of ocular infections. *Infect Dis Clin* 1989; 3 (3):533-51.
- 250) Barza M. Animal models in the evaluation of chemotherapy of ocular infections. In: Zak O, Sande MA.: *Experimental models in antimicrobial chemotherapy*. Academic Press 1986; 11 (10):187-211.
- 251) Maurice DM, Polgar J. Diffusion across the sclera. *Exp Eye Res*. 25:577-82.
- 252) Benet LZ, Mitchell JR, Sheiner LB. Farmacocinética: dinámica de la absorción, distribución y eliminación de los fármacos. En: Goodman y Gilman: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 8ª ed. Interamericana S.A. (ed.), México, 1991; 1:21-48.
- 253) Bonafonte S, Muiños A, Martínez OM. *Esquemas clínico-visuales en oftalmología*. 2ª ed, Doyma S.A. (ed.), 1992; 5:16.
- 254) Doane MG, Jensen AD, Dohlman CH. Penetration routes of topically applied eye medications. *Am J Ophthalmol* 1978; 85:383-6.

- 255) Shell JW. Pharmacokinetics of topically applied ophthalmic drugs. *Surv Ophthalmol* 1982; 26:207-18.
- 256) Davis SD, Sarff LD, Hyndiuk RA. Antibiotic therapy of experimental *Pseudomonas* keratitis in guinea pigs. *Arch Ophthalmol* 1977; 95:1638-43.
- 257) Davis SD, Sarff LD, Hyndiuk RA. Topical tobramycin therapy of experimental *Pseudomonas* keratitis. An evaluation of some factors that potentially enhance efficacy. *Arch Ophthalmol* 1978; 96:123-5.
- 258) Wine AN, Gornall AG, Basu PK. The ocular uptake of subconjunctivally injected C14 hydrocortisone. *Am J Ophthalmol* 1964; 58:362-6.
- 259) McCartney HJ, Drysdale IO, Gornall AG, Basu PK. An autoradiographic study of the penetration of subconjunctivally injected hydrocortisone into the normal and inflamed rabbit eye. *Invest Ophthalmol* 1965; 4:297-302.
- 260) Barza M, Kane A, Baum J. Excretion of gentamicin in rabbit tears after subconjunctival injection. *Am J Ophthalmol* 1978; 85:118-20.
- 261) Levine ND, Aronson SB. Orbital infusion of steroids in the rabbit. *Arch Ophthalmol* 1970; 83:599-607.
- 262) Barza M, Kane A, Baum J. Intraocular penetration of gentamicin after subconjunctival and retrobulbar injection. *Am J Ophthalmol* 1978; 85:541-7.
- 263) Barza M, Kane A, Baum J. Ocular penetration of subconjunctival oxacillin, methicillin and cefazolin in rabbits staphylococcal endophthalmitis. *J Infect Dis* 1982; 145:899-903.

- 264) Leibowitz HM, Ryan WJ, Kupferman A. Route of antibiotic administration in bacterial keratitis. *Arch Ophthalmol* 1981; 99:1420-3.
- 265) Wright RE, Stuart-Harris CH. Penetration of penicillin into the eye. *Br J Ophthalmol* 1945; 29:428-36.
- 266) Von Sallmann L. Controversial points in ocular penicillin therapy. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1947; 45:570-636.
- 267) Leopold IH, Wiley M, Dennis R. Vitreous infections and streptomycin. *Am J Ophthalmol* 1947; 30:1345-51.
- 268) Erlanger G. Iontophoresis, a scientific and practical tool in ophthalmology. *Ophthalmologica. Basel*, 1954; 128:232-46.
- 269) Witzel SH, Fielding IZ, Ormsby HL. Ocular penetration of antibiotics by iontophoresis. *Am J Ophthalmol* 1956; 42:89-94.
- 270) Graybill JR, Craven PC, Taylor RL, Williams DM, Magee WE. Treatment of murine cryptococcosis with liposome-associated amphotericin B. *J Infect Dis* 1982; 145:748-52.
- 271) Taylor RL, Williams DM, Craven PC, Graybill JR, Drutz DJ, Magee WE. Amphotericin B in liposomes: a novel therapy for histoplasmosis. *Am Rev Resp Dis* 1982; 125:610-1.
- 272) Tremblay C, Barza M, Fiore C, Szoka F. Efficacy of liposome-intercalated amphotericin B in the treatment of systemic candidiasis in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 26:170-3.

- 273) Schaeffer HE, Krohn DL. Liposomes in topical drug delivery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982; 22:220-7.
- 274) Lee VHL, Urrea PT, Smith RE, Schanzlin DJ. Ocular drug bioavailability from topically applied liposomes. *Surv Ophthalmol* 1985; 29:335-48.
- 275) Barza M, Baum J, Szoka F. Pharmacokinetics of subconjunctival liposome encapsulated gentamicin in normal rabbit eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984; 25:486-90.
- 276) Morgan JR, Williams KE. Preparation and properties of liposome-associated gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 17:544-8.
- 277) Jones RN, Barry AL, Gavan TL, Washington II JA. Susceptibility Tests: Microdilution and Macrodilution Broth Procedures. In: Lennette EH, Balows A, Hausler Jr, Shadomy HJ. (ed.): *Manual of Clinical Microbiology*. 4<sup>a</sup> ed. American Society for Microbiology. Washington DC, 1985; 101:972-7.
- 278) Pastor A, Cantón E, Gobernado M. Efecto postantibiótico (EPA). II. Antimicrobianos en que se ha descrito EPA, con especial referencia a las quinolonas. *Rev Esp Quimioterap* 1992; 5 (3):211-8.
- 279) Zato MA, Muro A, Gil Bernabé JF, Prieto J. *In vitro* and experimental study of the efficiency of ofloxacin in ocular infections. *Ophthalmology Today* 1988; 455-64.
- 280) Moreno Lopez M, Dámaso D, Perea EJ. Doctrina actual en el uso de los antibióticos. En: Harofarma (ed.): *Selección de monografías Beecham*. 1981; 4:46-64.
- 281) Oakley DE, Weeks RD, Ellis PP. Corneal distribution of subconjunctival antibiotics. *Am J Ophthalmol* 1976; 81 (3):307-12.

- 282) Davis SD, Sarff LD, Hyndiuk RA. Comparison of therapeutic routes in experimental *Pseudomonas* keratitis. *Am J Ophthalmol* 1989; 87:710-6.
- 283) Matoba AY, McCulley JP. The effect of therapeutic soft contact lenses on antibiotic delivery to the cornea. *Ophthalmology* 1985; 92:97-9.
- 284) Mahajan VM. Acute bacterial infections of the eye: their aetiology and treatment. *Br J Ophthalmol* 1983; 67:191-4.
- 285) Seal DV, Barrett SP, McGill JI. Aetiology and treatment of acute bacterial infection of the external eye. *Br J Ophthalmol* 1982; 66:357-60.
- 286) Locatcher-Khorazo D, Seegal BC. *Microbiology of the eye*. St. Louis Mosby, 1972.
- 287) Baum JL. Ocular infections. *N Engl J Med* 1978; 299:28-32.
- 288) Hirst LW, Thomas JV, Green WR. Keratitis. In: Mandell GL, Douglas RC Jr, Bennett JE. (ed.): *Principles and practice of infectious diseases*. 2<sup>a</sup> ed. New York, John Wiley & Sons Inc., 1985; 754-60.
- 289) Smolin G, Okumoto M. Staphylococcal blepharitis. *Ophthalmol* 1977; 95:812-6.
- 290) Agarwal LP, Nair RV, Sood NN, Mahajan VM. Role of trauma and corticosteroids in causation of corneal pathology by commensals. *East Arch Ophthalmol* 1976; 4:1-6.
- 291) Khosla PK, Angra SK, Agarwal LP. Postoperative staphylococcal infection. *East Arch Ophthalmol* 1964; 2:240-2.
- 292) Allen MF, Mangiarcine AB. Bacterial endophthalmitis after cataract extraction. *Arch Ophthalmol* 1964; 72:454-62.

- 
- 293) Valenton MJ, Brubaker RF, Allen HF. *Staphylococcus epidermidis* (albus) endophthalmitis (report of two cases after cataract extraction). *Arch Ophthalmol* 1973; 89:94-6.
- 294) Pettit TH. Management of bacterial corneal ulcers. In: Leopold IH, Burns RP. (ed.): *Symposium on ocular therapy*. New York, John Wiley & Sons Inc., 1976; 8:57-65.
- 295) Laibson PR. Cornea and sclera. *Arch Ophthalmol* 1972; 88:553-74.
- 296) Kupferman A, Leibowitz HM. Quantitation of bacterial infection and antibiotic effect in the cornea. *Arch Ophthalmol* 1976; 94:1981-4.
- 297) Kupferman A, Leibowitz HM. Topical antibiotic therapy of staphylococcal keratitis. *Arch Ophthalmol* 1977; 95:1634-7.
- 298) Davis SD, Sarff LD, Hyndiuk RA. Staphylococcal keratitis. Experimental model in guinea pigs. *Arch Ophthalmol* 1978; 96:2114-6.
- 299) Wilhelmus KR. Bacterial corneal ulcers. *Int Ophthalmol Clin* 1984; 24 (2):1-16.
- 300) Adams CP Jr, Cohen EJ, Laibson PR, *et al.* Corneal ulcers in patients with cosmetic extended-wear contact lenses. *Am J Ophthalmol* 1983; 96:705-9.
- 301) Baum JL. Initial therapy of suspected microbial corneal ulcers. I. Broad antibiotic therapy based on prevalence of organisms. *Surv Ophthalmol* 1979; 24:97-105.
- 302) Smolin G, Okumoto M, Wilson FM. The effect of tobramycin on gentamicin-resistant strains in *Pseudomonas* keratitis. *Am J Ophthalmol* 1974; 77:583-8.

- 
- 303) Young LS, Hindler J. Aminoglycoside resistance: a worldwide experience. *Am J Med* 1986; 80 (6B):15-21.
- 304) Mehta NJ, Webb RM, Krohe, GB, *et al.* Clinical inefficacy of tobramycin and gentamicin sulfate in the treatment of ocular infections. *Cornea* 1984/85; 3:228.
- 305) Eng RHK, Smith SM, Cherubin CE, Tan EN. Evaluation of two methods for overcoming the antibiotic carryover effect. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10:34-8.
- 306) Lorian V. Effects of low antibiotic concentrations on bacteria: effects on ultrastructure, their virulence, and susceptibility to immunofrondrd. In: Lorian V (ed.): *Antibiotics in Laboratory Medicine*. The Williams & Wilkins Co (ed.). Baltimore, 1986; 596-668.
- 307) Gudmundsson S, Vogelmann B, Craig WA. Reduced susceptibility of bacteria during the postantibiotic effect to bactericidal antimicrobials. In: Program and abstracts of the twenty-third Interscience Conference of the American Society for Microbiology, Washington DC, 1983; 249.
- 308) Gudmundsson S, Vogelmann B, Craig WA. Postantibiotic effect for newer antimicrobials. In: Program and abstracts of the twenty-fourth Interscience Conference of the American Society for Microbiology, Washington DC, 1984); 289.
- 309) Pastor A, Cantón E, Gobernado M. Efecto postantibiótico (EPA). I. Métodos de estudio y factores influyentes. *Rev Esp Quimioterap* 1992; 5 (3):201-10.
- 310) Meng X, Nightingale CH, Sweeney KR. Cuantificación de *in vitro* postantibiotic effect based on the mean recovery-time. II: A comparison of colony counting versus photometrics methods for the determination of bacterial growth. *J Antimicrob Chemother* 1991; 28 (4):515-21.

- 
- 311) Gottfredsson M, Erlendsdottir H, Kolka R, Gudmundsson A, Gudmundsson S. Ultrastructural alterations of bacteria during the postantibiotic effect. *Chemotherapy* 1993; 39 (3):153-62.
- 312) Hanberger H. Pharmacodynamic effects of antibiotics. Studies on bacterial morphology, initial killing, postantibiotic effect and effective growth time. *Scand J Infect Dis* 1992; 81:1-52.
- 313) Hanberger H, Nilsson LE, Maller R, Isaksson B. Pharmacodynamics of daptomycin and vancomycin on *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* demonstrated by studies of initial killing and postantibiotic effect and influence of Ca<sup>2+</sup> and albumin on these drugs. *Antimicrob Agent Chemother* 1991; 35 (9):1710-6.
- 314) Hanberger H, Nilsson LE, Nilsson M, Maller R. Postantibiotic effect of beta-lactam antibiotics on gram-negative bacteria in relation to morphology, initial killing and MIC. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10 (11):927-34.
- 315) Hanberger H, Nilsson LE, Svensson E, Maller R. Synergic postantibiotic effect of mecillinam, in combination with other beta-lactam antibiotics in relation to morphology and initial killing. *J Antimicrob Chemother* 1991; 28 (4):523-32.
- 316) Odenholt I, Isaksson B, Nilsson L, Cars O. Postantibiotic and bactericidal effect of imipenem against *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989; 8 (2):136-41.
- 317) Zhanel GG, Hoban DJ, Harding GKM. The postantibiotic effect: A review of *in vitro* and *in vivo* data. *DICP Ann Pharmacother* 1991; 25:153-63.
- 318) Shimada K, Kato H. Schedule of intermittent cephalothin therapy. In: Williams JD, Geddes AM. (ed.): *Penicillins and cephalosporins*. Plenum, New York, Chemotherapt 1976; 5:277-82.

- 
- 319) Fuursted K. Postantibiotic effect of ciprofloxacin on *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol* 1987; 6 (3):271-4.
- 320) McDonald PJ, Craig WA, Kunin CM. Brief antibiotic exposure and effect on bacterial growth. In: Williams JD, Geddes AM. (ed.): *Penicillins and cephalosporins*. Plenum, New York, Chemotherapt 1976; 2:95-102.
- 321) Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; 45:493.
- 322) Corrado ML, Landesman SH, Cherubin C. Influence of inoculum size on activity of cefoperazone, cefotaxime, moxalactam, piperacillin and N-formimidoyl, thienamycin (MKO787) against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 18:893-6.
- 323) Chapman S, Sttiebigel R. Staphylococcal B-lactamase and efficacy of b-lactam antibiotics *in vitro* and *in vivo* evaluation. *J Infect Dis* 1981; 147:1078-89.
- 324) Eng RH, Cherubin C, Smith SM, Buccini F. Inoculum effect of B-lactam antibiotics on *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28:601-6.
- 325) Bulger RR, Washington JA II. Effect of inoculum size and B-lactamase productives on *in vitro* activity of new cephalosporins against *Haemophilus* species. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 17:393-6.
- 326) Gwynn MN, Rolinson GN. Selection of variants of *Pseudomonas aeruginosa* resistant to B-lactam antibiotics. *Infect* 1980; 8:73-80.
- 327) Thrupp LD. Susceptibility testing of antibiotics in liquid media. In: Lorian V.: *Antibiotics in laboratory medicine*. 2nd. ed. The Williams & Wilkins Co (ed.). Baltimore, 1986; 93-150.

- 328) Nadler HL, Pitkin DH, Sheikh W. The postantibiotic effect of meropenem and imipenem on selected bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1989; 24 (A):225-31.
- 329) Odenholt TI. Pharmacodynamics of beta-lactam antibiotics. Studies on the paradoxical and postantibiotic effects *in vitro* and in an animal model. *Scand J Infect Dis* 1989; 58:1-55.
- 330) Borobio MV, Perea EJ. Effect of inoculum, pH and medium on the activity of ciprofloxacin against anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 25:342-3.
- 331) Morrissey J, Lewin CS, Smith JT. The influence of oxygen up on bactericidal potency. In: Crumplin GC. (ed.): *The 4-quinolones:antibacterial agents in vitro*. Springer Verlag, London, 1990; 23-6.
- 332) Kirby WMM, Craig WA. Theory and applications of pulse dosing: a summary of the symposium. *Rev Infect Dis* 1981; 3:1-3.
- 333) Tuomanen E. Newly made enzymes determine ongoing cell wall synthesis and the antibacterial effects of cell wall synthesis inhibitors. *J Bacteriol* 1986; 167:535-43.
- 334) Feld R, Valdivieso M, Bodey GP, Rodriguez V. A comparative trial of sisomicin therapy by intermittent *versus* continuous infusion. *Am J Med Sci* 1977; 274:179-88.
- 335) Lee C, Blaser J, Luthy R. Post antibiotic effect (PAE) is markedly influenced by shaking conditions during exposure to antibiotic concentrations. In: Program and Abstracts of the twenty-second Interscience Conference on Antimicrobial Agent and Chemotherapy. Abstract 383. Am Soc Microb, Washington DC, 1982; 133.

- 
- 336) Koch AE, Burchall JJ. Reversal of the antimicrobial activity of trimethoprim by thymidine in commercially prepared media. *Appl Microbiol* 1971; 22:812-7.
- 337) Zhanel GG, Karlowsky JA, Davidson RJ, Hoban DJ. Effect of pooled human cerebrospinal fluid on the postantibiotic effects of cefotaxime, ciprofloxacin, and gentamicin against *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 35 (5):1136-9.
- 338) Davidson RJ, Zhanel GG, Phillips R, Hoban DJ. Human serum enhances the postantibiotic effect of fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35 (6):1261-3.
- 339) Erickson HM, Sherris JC. Antibiotic sensitivity testing. Report of an International Collaborative Study. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1971; Suppl B:217.
- 340) Ingham HR, Selkon KB, Codd AA, Hale JK. The effect of carbodioxide on the sensitivity of *Bacteroides fragilis* to certain antibiotics *in vitro*. *J Clin Pathol* 1970; 23:254-8.
- 341) Espinoza AM, Chin X, Novelli A, Neu HC. Comparative *in vitro* activity of a new fluorinated 4-quinolone, T-3262 (A-60969). *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32:663-70.
- 342) Neu HC, Novelli A, Chin X. Comparative *in vitro* activity of new quinolone, AM-1091. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33:1036-41.
- 343) Chapman JS, Georgepapadakou NH. Routes of quinolone permeation in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32:438-42.

- 
- 344) Percival A, Nicoletti G. Ciprofloxacin, Clinical evaluation (IV). 6th Mediterranean Congress of Chemotherapy. Italy, 1988.
- 345) Kumada T, Neu HC. *In vitro* activity of ofloxacin, a quinolone carboxylic acid compared to other quinolones and other antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother* 1985; 16:563-74.
- 346) Perez Giraldo C, Blanco Roca MT, Prieto Prieto J. Modelos experimentales *in vitro* para la valoración de antimicrobianos. En: Prieto Prieto J, Gomez García AC. Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Badajoz. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Extremadura: Actualización en Microbiología Clínica. Antimicrobianos-1986. 119-26.
- 347) Reeves DS, Bywater MJ, Holt HA, Withe LO. *In vitro* studies with ciprofloxacin, a new 4-quinolone compound. *J Antimicrob Chemother* 1984; 27:297-301.
- 348) Anderson JD. The relevance of urine and serum antibacterial activity to the treatment of urinary tract. *J Antimicrob Chemother* 1979; 2:226-8.
- 349) Bergan T, Carlsen JB. Effects of antibiotics eliminated by first order kinetics. *J Antimicrob Chemother* 1985; 15 Suppl A:147-52.
- 350) Benet LZ, Mitchell JR, Sheiner LB. Introducción En: Goodman y Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica. 8ª ed. Interamericana S.A. (ed.), México, 1991; 19-20.
- 351) Martinez Martinez L, Perea EJ. Fundamentos microbiológicos de la terapéutica antimicrobiana. En: Perea EJ.: Enfermedades infecciosas. Doyma, S.A. (ed.), 1991; 12:199-226.

- 352) O'Grady F. Modelos animales en la valoración de antimicrobianos. *J Antimicrob Chemother* 1976; 2:1-8.
- 353) Cleeland R, Grunberg E. Laboratory evaluation of new antibiotics *in vitro* and in experimental animal infections. In: Lorian, V.: *Antibiotics in Laboratory Medicine* 2nd. ed. The Williams & Wilkins Co (ed.). Baltimore, 1986; 537-98.
- 354) Sande MA. Animal models as predictors of therapeutic efficacy in bacterial infections in man. *Current Chemother Am Soc Microb* 1980.
- 355) Barza M. A critique of animal models in antibiotic research. *Scand J Infect Dis* 1978; 14:109-17.
- 356) Bergeron MG. A review of models for the therapy of experimental infections. *Scand J Infect Dis* 1978; 14:189-206.
- 357) Jue B, Maurice DM. The mechanical properties of the rabbit and human cornea. *J Biomech* 1986; 19 (10):847-53.
- 358) Sande MA. Animal models in the evaluation of antimicrobial agents. (Guest editorial) *Infect Dis, New York*, 1981; 4 (11):4-20.
- 359) Zak O. Usefulness and limitations of animal models in the study of opportunistic nonbacterial infections. In: Klatersky J. (ed.): *Infections in cancer patients*. Raven Press New York, 1982; 25-45.
- 360) Zak O, Sande MA. Correlation of *in vitro* antimicrobial activity of antibiotics with results of treatment in experimental animal models and human infection. In: Babath LD. (ed.): *Action of antibiotics in patients*. Hans Huber Publishers Bern Stuttgart & Vienna, 1982; 55-67.

- 361) Zak O, Sande MA. Introduction: the role of animal models in the evaluation of new antibiotics. *Experimental models in antimicrobial. Chemotherapy*. Academic Press Inc, London, 1988; 1:1-5.
- 362) Maurice DM. Injection of drugs into the vitreous body. In: Leopold IH, Burns RP. (ed.): *Symposium on Ocular therapy*. John Wiley and Sons, New York, 1976; 9:59-72.
- 363) Gerge JR, Magliocco MV. Experimental *Pseudomonas aeruginosa* infection of the mouse cornea. *Infect Immun* 1971; 3:209-16.
- 364) Bohigian G, Okumoto M, Valenton M. Experimental *Pseudomonas* keratitis. *Arch Ophthalmol* 1971; 86:432-8.
- 365) Crompton DO, Anderson KF, Kennare MA. Experimental infection of the rabbit anterior chamber. *Trans Ophthalmol Soc* 1962; 22:81-98.
- 366) Maylath FR, Leopold IH. Study of experimental intraocular infection. *Am J Ophthalmol* 1955; 40:86-101.
- 367) Zehetbauer G, Robert SR. Antibacterial effects in the vitreous. *Am J Ophthalmol* 1962; 54:797-800.
- 368) Forster RK, Zachary IG, Cottingham AJ Jr. Diagnosis and treatment of endophthalmitis. In: Leopold IH, Burns RP. (ed.): *Symposium on Ocular therapy*. John Wiley and Sons, New York, 1976; 1:51-8.
- 369) Van Horn DL, Davis SD, Hynduik RA, Alpren TVP. Pathogenesis of experimental *Pseudomonas* keratitis in the guinea pigs: bacteriologic, clinical and microscopic observations. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 1978; 17 (11):1076-86.

- 370) Davis SD, Chandler JW. Experimental keratitis due to *Pseudomonas aeruginosa*: Model for evaluation of antimicrobial drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 1975; 8:350-5.
- 371) Keesler E, Mondino BJ, Brown SI. The corneal response to *Pseudomonas aeruginosa*: histopathological and enzymatic characterization. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 1977; 16:116-25.
- 372) Leopold IH, Holmes LF, LaMotte WO Jr. Local versus systemic penicillin therapy of rabbit corneal ulcer produced by gram negative rod. *Arch Ophthalmol* 1944; 32:193-5.
- 373) Baum J, Barza M. Topical vs. subconjunctival treatment of bacterial corneal ulcers. *Ophthalmol* 1983; 90:162-8.
- 374) Durantez Cacharro J, Gorosabel Rebolleda C, Sanz L. Diagnóstico bacteriológico de las úlceras corneales: modelo experimental. *Arch Soc Esp Oftal* 1984; 47:93-100.
- 375) Fernández Vigo J. Modelo experimental de queratitis por *Staphylococcus aureus*. *Arch Soc Esp Oftal* 1982; 43:259-66.
- 376) Liolet S. La flore microbienne conjonctivale préopératoire et sa sensibilité aux antibiotiques. *J Fr Ophtalmol* 1979; 2:449-58.
- 377) Fuursted K. Comparative killing activity and postantibiotic effect of Streptomycin combined with ampicillin, ciprofloxacin, imipenem, piperacillin or vancomycin against strains of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium*. *Chemotherapy* 1988; 34:229-34.

- 378) Zhanel GG, Davidsson RJ, Hoban DJ. Reproducibility of the *in vitro* postantibiotic effect of fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 1990; 26:724-6.
- 379) Zhanel GG, Karlowsky JA, Davidsson RJ, Hoban DJ. Influence of human urine on the *in vitro* activity and postantibiotic effect of ciprofloxacin against *E. coli*. Chemotherapy 1991; 37:218-23.
- 380) Alados JC, Maroto MC, Liébana J, Piédrola G. Efecto postantibiótico y cinética de letalidad de dos quinolonas frente a aislados clínicos de *Shigella sonnei*. Rev Esp Quimioterap 1989; 2 (3):245-8.
- 381) Gould IM, Jason AC, Milne K. Postantibiotic effect and bacterial killing by ciprofloxacin and imipenem alone and in combination. Rev Esp Quimioterap 1989; 2 (5):957.
- 382) Mínguez F, Gómez-Lus ML, Muro A, Cambroner MJ, Gomis M, Prieto J. Comparative study of the postantibiotic effect of cefotaxime, amoxicillin, ofloxacin and pefloxacin. Rev Infect Dis 1989; 2 (5):955-7.
- 383) Ramos Tejera C. Propiedades antimicrobianas de las quinolonas con especial referencia al efecto postantibiótico de ciprofloxacino. U.C.M., Facultad de Medicina, Departamento de Microbiología, Madrid, 1994.
- 384) Drabu YJ, Blakemore PH. The postantibiotic effect of teicoplanin: monotherapy and combination studies. J Antimicrob Chemother 1991; 27(B):1-7.
- 385) Schmitt DD, Edmiston CE, Krepe, C, Gohr C, Seabrook GR, Bandyk DF, *et al.* Impact of postantibiotic effect on bacterial adherence to vascular prostheses. J Surg Res 1990; 48 (4):373-8.

- 386) Gudmundsson S, Einarsson S, Erlendsdottir H, Moffat J, Bayer W, Craig WA. The postantibiotic effect of antimicrobial combinations in a neutropenic murine thigh infection model. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31(D):177-91.
- 387) Dominguez MC, Alados JC, Partal Y, Molina JM, Martínez-Brocal A, Rosa M. Nuevo método espectrofotométrico de determinación del efecto postantibiótico (EPA). Abstract 549, V Congreso de la SEIMC, Barcelona, Nov. 1992.
- 388) Craig WA, Ebert SC. Killing and regrowth of bacteria *in vitro*: a review. *Scand J Infect Dis* 1991; 74:63-70.
- 389) Isaksson B, Maller R, Nilsson LE, Nilsson M. Postantibiotic effect of aminoglycosides on staphylococci. *J Antimicrob Chemother* 1993; 32 (2):215-22.
- 390) Mínguez F, Agra M, Lurueña S, Ramos C, Prieto J. Postantibiotic effect of isepamicin compared to that of other aminoglycosides. *Drugs Exptl Clin Res* 1990; XVI (5):231-5.
- 391) Zhanel GG, Karlowsky JA, Hoban DJ, Davidsson RJ. Antimicrobial activity of subinhibitory concentrations of aminoglycosides against *P. aeruginosa* as determined by the killing-curve method and the postantibiotic effect. *Chemotherapy* 1991; 37 (2):114-21.
- 392) Mínguez F, Gómez-Lus ML, Redondo M, Corrales I, Prieto J. Efecto postantibiótico de amoxicilina y netilmicina sobre cultivos puros y asociados de *S. aureus* y *E. coli*. *Rev Esp Microbiol Clin* 1989; 4(7):419-24.
- 393) Mínguez F, Corrales I, Gómez-Lus ML, Lurrueña S, Prieto J. Valoración del efecto postantibiótico de cinco grupos de antimicrobianos sobre *S. aureus* y *E. coli*. *Rev Esp Quimioterap* 1989; 11(2):161-5.

- 394) Nilsson L. New rapid bioassay of gentamicin based on luciferase assay of extracellular ATP in bacterial cultures. *Antimicrob Agents Chemother* 1978; 14:812-6.
- 395) Abbot RL, Abrams MA. Bacterial corneal ulcers. In: Tasman W, Jaeger EA.: *Clinical Ophthalmology*. Philadelphia, Lippincott JB, Company (ed.), 1986; 1-34.
- 396) Mitsui Y, Sakuragi S, Tamura O, Abe M, Wat5nabe I, Ueno M, *et al.* Effect of ofloxacin ophthalmic solution in the treatment of external bacterial infections of the eye. *Folia Ophthalmol (Jpn)*, 1986; 37:1115.
- 397) Hirose H, *et al.* A case of corneal ulcer caused by antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Folia Ophthalmol (Jpn)*, 1989; 40:20-5.
- 398) Blanco MT, Mediero J, Blanco J. El antibiograma. Su utilidad. En: Prieto Prieto J, Gomez García AC. Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Badajoz. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Extremadura: Actualización en Microbiología Clínica. *Antimicrobianos-1986*. 67-74.
- 399) Eagle H, Magnuson HJ, Fleischman R. The effect of the method of administration on the therapeutic efficacy of sodium penicillin in experimental syphilis. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1946;79:168-89.
- 400) Eagle H, Fleischman R, Musselman AD. Effect of schedule of administration on the therapeutic efficacy of penicillin. *Am J Med* 1950; 9:280-99.
- 401) Eagle H, Fleischman R, Levy M. On the duration of penicillin action in relation to its concentration in the serum. *J Lab Med* 1953; 41:122-32.

- 402) Schmidt LH, Walley A, Larson RD. The influence of the dosage regimen on the therapeutic activity of penicillin G. *J Pharmacol Exp Ther* 1949; 96:258-68.
- 403) Altemeier WA. Penicillin therapy with prolonged interval dosage schedules. *Ann Surg* 1948;128:708-12.
- 404) Hamburger MJR, Berman JR, Thompson RT, Blankenhorn MA. The treatment of pneumococcal pneumonia by penicillin in aqueous solution at long intervals. *J Lab Clin Med* 1949; 34:59-66.
- 405) Meads M, Harris HW, Finland M. Treatment of pneumococcal pneumonia with penicillin. *N Engl J Med* 1945; 232:747-55.
- 406) Price AH. Aqueous penicillin therapy for pneumococcal pneumonia. *JAMA* 1948; 138:292-3.
- 407) Tompsett R, Timpanelli A, Goldstein O, McDermott W. Discontinuous therapy with penicillin. *JAMA* 1949; 139:555-60.
- 408) Tumulty PA, Zubrod G. Pneumococcal pneumonia treated with aqueous penicillin at twelve-hour intervals. *N Engl J Med* 1948; 39:1033-6.
- 409) Weinstein LS, Perrin TS. Treatment of scarlet fever with penicillin G administered orally three times a day. *J Pediatr* 1950; 37:844-53.
- 410) Weinstein LS, Daikos G. Treatment of scarlet fever with crystalline penicillin G administered orally or parenterally two times a day. *Am Pract Dig Treatment* 1951; 2:60-4.

- 
- 411) Howard BM, Pinney RJ, Smith T. Postantibiotic effects of ofloxacin on *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus pyogenes*. *Chemotherapy* 1993; 39(4):265-71.
- 412) Jiménez T, Cantón E, Ramón MS, Gobernado M. Estudio cinético de la actividad bactericida de lomefloxacino sobre *Staphylococcus aureus* Sa-1 y *Pseudomonas aeruginosa* Psa-1. *Rev Esp Quimioterap* 1990; 3:357-61.
- 413) Guan L, Blumenthal RM, Burnham JC. Analysis of macromolecular biosynthesis to define the quinolone-induced postantibiotic effect in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36(10):2118-24.
- 414) Turnidge JD. Prediction of antibiotic dosing intervals from *in vitro* susceptibility, pharmacokinetics and postantibiotic effects: theoretical considerations. *Scand J Infect Dis* 1990; Suppl 74:137-41.
- 415) Levison ME, Bush LM. Pharmacodynamics of antimicrobial agents. Bactericidal and postantibiotic effects. *Infect Dis Clin North Am* 1989; 3(3):415-21.
- 416) Hessen MT, Pitsakis PG, Levison ME. Postantibiotic effect of penicillin plus gentamicin versus *Enterococcus faecalis* *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989 33(5):608-11.
- 417) Craig WA. Postantibiotic effects in experimental infection models: relationship to *in vitro* phenomena ant to treatment of infections in man. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31 Suppl D:149-58.
- 418) Tomii T, Fukuda M, Sasaki K. Studies on the maintenance of microbial agents in ocular tissues following topical administration. *Proceedings of 15th Int Congress*

- Chemother, Istambul (Jul 1987). In: Landsberg/Lech: ecomed (ed.): Progress in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy, Antimicrobial Section 2. 1987; 1:236-8.
- 419) Davis SD, Sarff LD, Hyndix RA. Therapeutic effect of topical antibiotic on untreated eye in experimental keratitis. Can J Ophthalmol 1978; 13:273-6.

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

---

Fig. 1: Estructura química de ofloxacino. ....	25
Fig. 2: Estructura química de tiamfenicol. ....	33
Fig. 3: Estructura química de rifampicina. ....	38
Fig. 4: Estructura química de gentamicina y tobramicina. ....	44
Fig. 5: EPA de ofloxacino a CMI, 6'8 µg/ml y 10 CMI frente a <i>S. pneumoniae</i> ATCC 6303. ....	90
Fig. 6: EPA de tiamfenicol a CMI y 10 CMI frente a <i>S. pneumoniae</i> ATCC 6303. ..	90
Fig. 7: EPA de rifampicina a CMI y 10 CMI frente a <i>S. pneumoniae</i> ATCC 6303. ..	91
Fig. 8: EPA de gentamicina a CMI y 10 CMI frente a <i>S. pneumoniae</i> ATCC 6303. ....	91
Fig. 9: EPA de tobramicina a CMI y 10 CMI frente a <i>S. pneumoniae</i> ATCC 6303. ..	92
Fig. 10: EPA de tobramicina a CMI y 10 CMI frente a <i>S. pneumoniae</i> ATCC 6303. ....	92
Fig. 11: EPA de ofloxacino a CMI, 5 CMI y 10 CMI frente a <i>S. aureus</i> ATCC 29213. ....	92
Fig. 12: EPA de tiamfenicol a CMI y 10 CMI frente a <i>S. aureus</i> ATCC 29213. ....	93
Fig. 13: EPA de rifampicina a CMI y 10 CMI frente a <i>S. aureus</i> ATCC 29213. ....	93
Fig. 14: EPA de gentamicina a CMI y 10 CMI frente a <i>S. aureus</i> ATCC 29213. ....	94
Fig. 15: EPA de tobramicina a CMI y 10 CMI frente a <i>S. aureus</i> ATCC 29213. ...	94
Fig. 16: EPA de ofloxacino a CMI y 10 CMI frente a <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228. ....	94
Fig. 17: EPA de tiamfenicol a CMI y 10 CMI frente a <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228. ....	95

---

Fig. 18: EPA de rifampicina a CMI y 10 CMI frente a <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.	95
Fig. 19: EPA de gentamicina a CMI y 5 CMI frente a <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.	95
Fig. 20: EPA de tobramicina a CMI frente a <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228. ....	96
Fig. 21: EPA de ofloxacino a CMI y 10 CMI frente a <i>E. coli</i> ATCC 25922. ....	96
Fig. 22: EPA de rifampicina a CMI, 4 CMI y 10 CMI frente a <i>E. coli</i> ATCC 25922.	97
Fig. 23: EPA de gentamicina a CMI y 10 CMI frente a <i>E. coli</i> ATCC 25922. ....	97
Fig. 24: EPA de tobramicina a CMI y 10 CMI frente a <i>E. coli</i> ATCC 25922. ....	97
Fig. 25: EPA de ofloxacino a CMI y 6'8 µg/ml frente a <i>P. vulgaris</i> ATCC 13315. ...	98
Fig. 26: EPA de tiamfenicol a CMI y 10 CMI frente a <i>P. vulgaris</i> ATCC 13315. ....	98
Fig. 27: EPA de rifampicina a CMI frente a <i>P. vulgaris</i> ATCC 13315. ....	98
Fig. 28: EPA de gentamicina a CMI y 10 CMI frente a <i>P. vulgaris</i> ATCC 13315. ...	99
Fig. 29: EPA de tobramicina a CMI y 10 CMI frente a <i>P. vulgaris</i> ATCC 13315. ....	99
Fig. 30: EPA de ofloxacino a CMI y 10 CMI frente a <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9721. ...	99
Fig. 31: EPA de tiamfenicol a CMI y 10 CMI frente a <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9721. ...	100
Fig. 32: EPA de rifampicina a CMI y 10 CMI frente a <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9721. ...	100
Fig. 33: EPA de gentamicina a CMI y 10 CMI frente a <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9721.	100
Fig. 34: EPA de tobramicina a CMI y 10 CMI frente a <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9721.	101

## **ÍNDICE DE TABLAS**

---

Tabla 1a: Valoración semiográfica de la córnea. ....	80
Tabla 1b: Valoración semiográfica de la cámara anterior. ....	80
Tabla 1c: Valoración semiográfica del iris. ....	81
Tabla 1d: Valoración semiográfica de la conjuntiva. ....	81
Tabla 2: Concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas de ofloxacino, tiamfenicol, rifampicina, gentamicina y tobramicina frente a cepas estándar de <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E coli</i> , <i>P. vulgaris</i> y <i>P. aeruginosa</i> . ....	89
Tabla 3: Efecto postantibiótico de ofloxacino, tiamfenicol, rifampicina, gentamicina y tobramicina frente a <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6303. ....	102
Tabla 4: Efecto postantibiótico de ofloxacino, tiamfenicol, rifampicina, gentamicina y tobramicina frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213. ....	102
Tabla 5: Efecto postantibiótico de ofloxacino, tiamfenicol, rifampicina, gentamicina y tobramicina frente a <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228. ....	102
Tabla 6: Efecto postantibiótico de ofloxacino, rifampicina, gentamicina y tobramicina frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922. ....	103
Tabla 7: Efecto postantibiótico de ofloxacino, tiamfenicol, rifampicina, gentamicina y tobramicina frente a <i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315. ....	103
Tabla 8: Efecto postantibiótico de ofloxacino, tiamfenicol, rifampicina, gentamicina y tobramicina frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9721. ....	103
Tabla 9: Queratitis por <i>S. pneumoniae</i> ATCC 6303. Ensayo con ofloxacino. Resultados clínicos. ....	107
Tabla 10: Queratitis por <i>P. vulgaris</i> ATCC 13315. Ensayo con ofloxacino. Resultados clínicos. ....	107
Tabla 11: Queratitis por <i>S. pneumoniae</i> ATCC 6303. Ensayo con ofloxacino. Resultados microbiológicos. ....	109

---

Tabla 12: Queratitis por <i>P. vulgaris</i> ATCC 13315. Ensayo con ofloxacino. Resultados microbiológicos. ....	109
Tabla 13: Queratitis por <i>S. pneumoniae</i> ATCC 6303. Grupo Profilaxis. Resultados clínicos. ....	113
Tabla 14: Queratitis por <i>S. pneumoniae</i> ATCC 6303. Grupo Tratamiento. Resultados clínicos. ....	113
Tabla 15: Queratitis por <i>S. pneumoniae</i> ATCC 6303. Grupo Profilaxis. Resultados microbiológicos. ....	115
Tabla 16: Queratitis por <i>S. pneumoniae</i> ATCC 6303. Grupo Tratamiento. Resultados microbiológicos. ....	115
Tabla 17: Queratitis por <i>S. Pneumoniae</i> ATCC 6303. Grupo Profilaxis. Resultados del nº de bacterias viables encontradas en la córnea extraída. ....	117
Tabla 18: Queratitis por <i>S. Pneumoniae</i> ATCC 6303. Grupo Tratamiento. Resultados del nº de bacterias viables encontradas en la córnea extraída. .	117