

UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA

Departament de Medicina

Facultat de Medicina

Director: Dr. Albert Pahissa i Berga

Director: Dr. Joan Gavaldà i Santapau

**UTILIDAD DEL MODELO ANIMAL DE
ENDOCARDITIS PARA LA EVALUACIÓN DE
NUEVAS PAUTAS TERAPÉUTICAS**

Tesis presentada por Pedro Manuel López Onrubia
para la obtención del grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Barcelona 2003

INDICE

INDICE

Indice	2
1. Introducción	6
1. Endocarditis infecciosa	7
1.1 Generalidades	7
1.2. Epidemiología de la endocarditis infecciosa	8
1.3. Patogénesis y fisiopatología	13
1.3.1. Endocarditis trombótica no bacteriana	14
1.3.2. Factores hemodinámicas	15
1.3.3. Bacteriemia transitoria	16
1.3.4. Interacción microorganismo-ETNB	18
1.3.5. Factores inmunopatológicos	23
1.4. Cambios patológicos	26
1.5. Etiología de la endocarditis infecciosa	31
2. Tratamiento médico de la endocarditis infecciosa	32
2.1. Principios generales del tratamiento antimicrobiano	32
3. Modelo de endocarditis bacteriana en el conejo	34
3.1. Antecedentes del modelo	34
3.2. Ventajas y desventajas del modelo	34
3.3. Descripción de los distintos modelos	35
3.4. Principios generales del tratamiento de la endocarditis, aprendidos del modelo animal	41
4. Farmacocinéticas en animales y humanos	44
4.1. Generalidades	44
4.2. Modificación de las pautas de dosificación	45
4.3. Reducción de la tasa de eliminación	46

4.4. Uso de técnicas de infusión	47
4.5. Infusión continua y dosificación prolongada	47
4.6. Simulación en animales de laboratorio de las curvas de concentración-tiempo en humanos	49
4.6.1. Infusión de soluciones continuamente diluidas	49
4.6.2. Infusión de flujos variables	49
5. Técnicas y modelo matemático de farmacocinética humanizada	51
5.1. Estudio de la farmacocinética de los distintos antimicrobianos en el animal	52
5.2. Aplicación de un modelo matemático	55
5.2.1. Administración endovenosa en infusión corta según modelo de cinética de primer orden monocompartimental abierto (ej.: ampicilina)	55
5.2.2. Administración endovenosa en infusión continua según modelo de cinética de primer orden monocompartimental abierto (ej.: ampicilina)	57
5.2.3. Administración endovenosa en infusión corta según modelo de cinética de primer orden bicompartimental abierto (ej.: gentamicina, ceftriaxona, teicoplanina)	58
5.2.4. Administración endovenosa en infusión continua según modelo de cinética de primer orden bicompartimental abierto	

(ej.: gentamicina, ceftriaxona, teicoplanina)	61
5.3. Estudio de la farmacocinética humanizada en los animales	62
6. Endocarditis enterocócica	65
6.1. Características microbiológicas	65
6.2. Epidemiología	65
6.3. Características clínicas	66
6.4. Problemática del tratamiento de la endocarditis enterocócica	67
7. Perspectivas del tratamiento ambulatorio	70
2. Publicaciones	71
1. Objetivos generales	72
2. Estudio 1	73
2.1. Objetivos concretos estudio 1	74
3. Estudio 2	83
3.1. Objetivos concretos Estudio 2	84
4. Estudio 3	92
4.1. Objetivos concretos Estudio 3	93
Addendum	101
5. Estudio 4	102
5.1. Objetivos concretos Estudio 4	103
3. Resultados	108
1. Resultados Estudio 1	109
1.1. Estudios de sensibilidad <i>in vitro</i>	109
1.2. Estudios de sinergia	109
1.3. Estudios farmacocinéticos	110
1.4. Tratamiento de la endocarditis experimental	111

2. Resultados Estudio 2	113
2.1. Estudios de sensibilidad <i>in vitro</i>	113
2.2. Estudios farmacocinéticos	113
2.3. Tratamiento de la endocarditis experimental	114
3. Resultados Estudio 3	116
3.1. Estudios de sensibilidad <i>in vitro</i>	116
3.2. Estudios farmacocinéticos	116
3.3. Estudios de eficacia <i>in vivo</i>	117
4. Resultados Estudio 4	119
4.1. Estudios de sensibilidad <i>in vitro</i>	119
4.2. Estudios de eficacia <i>in vivo</i>	119
4. Discusión	120
1. Discusión del Estudio 1	121
2. Discusión del Estudio 2	126
3. Discusión del Estudio 3	131
4. Discusión del Estudio 4	135
5. Conclusiones	138
1. Conclusiones	139
6. Bibliografía	141

1. INTRODUCCION

1. Endocarditis Infecciosa

1.1. Generalidades

El término endocarditis infecciosa (EI) hace referencia a la infección de la superficie interna del corazón, el endocardio, e implica la presencia de microorganismos en la lesión. Aunque las válvulas cardiacas son las estructuras más comúnmente afectadas, la lesión también puede localizarse en defectos del septo o en el endocardio mural. También se incluyen dentro de este término la infección de comunicaciones arteriovenosas (*ductus arteriosus*), y la coartación de la aorta puesto que sus manifestaciones clínicas son similares.

Thayer ¹ fue el primero en utilizar el término de endocarditis infecciosa, y su uso se extendió gracias a Lerner y Weinstein ². Ya que otros microorganismos no bacterianos pueden ser responsables del síndrome, es preferible a la denominación de endocarditis bacteriana.

Como interés histórico, en el pasado la enfermedad se clasificó sobre la base del curso de la enfermedad sin tratar como "aguda", "subaguda" o "crónica". La forma aguda seguía un curso fulminante, con fiebre alta, toxicidad sistémica y leucocitosis, y la muerte acaecía entre unos días y menos de seis semanas. Esta evolución está clásicamente asociada con la infección causada por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria gonorrhoeae*. Las formas subagudas, en las cuales la muerte sobrevenía entre 3 a 6 meses, y las formas crónicas, en las que la muerte se producía más allá de los 3 meses, suelen considerarse en conjunto. Estas ocurren con frecuencia en válvulas con alteración previa y se caracterizan por un curso lento y tórpido, con fiebre de baja intensidad, sudoración nocturna, pérdida de peso y malestar sistémico difuso. Estas formas son clásicamente debidas a estreptococos del grupo "viridans". Aunque práctica, esta clasificación obvia las formas de endocarditis no bacterianas y el frecuente solapamiento de manifestaciones clínicas por microorganismos como los enterococos.

Es preferible una clasificación que se base en el agente etiológico, ya que esta implica consideraciones sobre el curso de la enfermedad, la probabilidad de alteración cardiaca preexistente y el tratamiento antimicrobiano a emplear.

A pesar de ser una enfermedad relativamente infrecuente, la endocarditis infecciosa atrajo en el pasado reciente la atención de la comunidad científica. Las manifestaciones clínicas son tan variadas, que pueden encontrarse en tratados de cualquier especialidad médica. El éxito del tratamiento dependía de una cooperación muy próxima entre especialidades médicas y quirúrgicas. La enfermedad también atrajo el interés de investigadores y los factores que influyen en su desarrollo son ahora mejor conocidos. No obstante, aún quedan muchas cuestiones en relación con aspectos únicos de esta infección. Por ejemplo, ¿por qué los organismos se alojan específicamente en las válvulas cardiacas en lugar de cualquier otro emplazamiento del árbol vascular? ¿Qué capacita a los microorganismos a sobrevivir en la superficie de la válvula tras su colonización? ¿Por qué un pequeño número de cepas y especies bacterianas causan la mayoría de endocarditis, mientras otras sólo causan bacteriemias? ¿Qué factores son responsables de la acusada variación en las manifestaciones de la enfermedad?, y ¿por qué es tan difícil de erradicar la infección con tratamiento antibiótico, incluso cuando el agente causal es extremadamente sensible a su acción *in vitro*?

1.2. Epidemiología de la endocarditis infecciosa

La incidencia de la EI es difícil de determinar, ya que los criterios diagnósticos y la metodología empleada para expresarla varían con las diferentes series ^{3, 4}. Los análisis basados en los casos de definición muy estrictos revelan a menudo que sólo una pequeña proporción, aproximadamente el 20% de los casos diagnosticados, se clasifican como endocarditis definitiva. Sin embargo, la EI representa alrededor del 1/1000 de admisiones hospitalarias, con un intervalo entre el 0,16 y el 5,4 de los casos por cada 1000 ingresos, según datos proporcionados por una revisión de 10 grandes estudios ^{3, 5}. Esta incidencia no ha cambiado en los últimos 30 años ⁶. Por ejemplo, en el condado de Olmstead, Minnesota, la incidencia media anual entre 1950 a 1981 fue de 3,8/100000 personas/año, sin registrar cambios significativos durante este intervalo ⁷. Una cifra similar de 1,7/100,000 personas/año se comunicó en un estudio prospectivo en Louisiana ⁸ y esta cifra es análoga a resultados obtenidos en estudios realizados en el Reino Unido ⁹. En otra serie de 210 episodios de EI vista en un gran hospital comunitario de Youngstown, Ohio, de 1980 hasta 1990 se documentó una tasa anual de 0,32–1,30 (media de 0,75) episodios por cada

1000 ingresos/año¹⁰. Por otro lado, en un estudio realizado en necropsias¹¹ no se detectaron cambios en la cifra anual de casos de EI en el Reino Unido desde 1939 a 1967. La proporción de casos agudos se ha incrementado desde un 20 % en la era preantibiótica hasta un 33 %^{5, 6}. A pesar de estos cambios en el espectro de la enfermedad, en la era antibiótica la EI aún permanece como una enfermedad prevalente, con una tasa de mortalidad significativa^{10, 12, 13}.

En la era antibiótica la media de edad de los enfermos con EI ha ido aumentando gradualmente. En 1926, la edad media era inferior a los 30 años¹, aumentó hasta los 39 años alrededor de 1943, y actualmente, más del 50% de los pacientes son mayores de 50 años^{6, 10, 14, 15}. En el momento actual, cerca del 54 % (41–69 %) de los casos ocurren en pacientes con edades comprendidas entre los 31 y 60 años, el 26% (12–40 %) en pacientes menores de 30 años de edad y el 21% (8–38%) en personas mayores de 60 años¹⁶. La media de edad de los pacientes con EI causada por estreptococos del grupo D es incluso superior: entre 61 y 67 años¹⁷. La enfermedad continúa siendo poco frecuente en niños y está primariamente asociada con (a) alteración estructural cardíaca congénita, en especial defectos del *septum* o lesiones complejas que implican defectos septales; (b) reparación quirúrgica de dichos defectos; o (c) bacteriemia nosocomial relacionada con catéter, especialmente en escolares^{18, 19}. La edad media de los hombres fue 6–7 años superior a la de las mujeres, y los hombres resultan más comúnmente afectados (54–69 % de los casos, la relación hombre/mujer es de 1,7:1 con un intervalo de 1,0–3,0:1 en 18 series)⁵. No obstante, en pacientes que estaban por debajo de los 35 años, la mayoría de los casos ocurrieron en mujeres. Diferentes factores pueden estar relacionados con estas diferencias en la distribución de edades. Primero, ha habido un cambio en el sustrato de enfermedades cardíacas predisponentes debido a la disminución en la incidencia de la fiebre reumática y la enfermedad reumática del corazón era un factor de importancia en el incremento de la enfermedad degenerativa en pacientes de mayor edad. Segundo, la edad de la población ha ido aumentando de forma consistente, y las personas con enfermedad reumática o congénita sobreviven más tiempo. Una nueva forma de la enfermedad, la endocarditis nosocomial, ha surgido como consecuencia de las múltiples manipulaciones a que se someten los enfermos ingresados en hospitales (catéteres intravenosos, vías de nutrición, marcapasos, “shunts” para diálisis y otras)³. En una

revisión de 125 casos de EI llevada a cabo en Seattle, el origen fue nosocomial en 35 casos (28%)²⁰. Por otro lado, en un estudio reciente la endocarditis fue nosocomial en sólo un 14,3 % de los casos, un 64 % de los pacientes estaban por encima de los 60 años, y la mortalidad fue elevada²¹. No obstante, es interesante que la incidencia de los microorganismos más comunes (estreptococos viridans), ajustada por edades, no ha cambiado de forma apreciable en el global de la enfermedad²².

La válvula cardiaca involucrada en la infección varía considerablemente con la proporción de casos agudos presentados en cada serie. La distribución oscila del 28 al 45% para la válvula mitral sola, del 5 al 36% para la válvula aórtica sola, y del 0 al 35 % para las válvulas aórtica y mitral combinadas. Las válvulas tricúspide y pulmonar raramente están implicadas (0-6 %) y (<1%), respectivamente^{14, 17, 20, 23}. La enfermedad simultánea de las cavidades derecha e izquierda está presente en 0-4 %¹⁶. La afectación de la válvula aórtica sola presenta un incremento en la frecuencia que se correlaciona con el aumento de los casos agudos; la incidencia era del 5 % en 1938 y ascendió al 39 % en el 1978¹⁴. La válvula aórtica está afectada en el 61% de los hombres pero sólo en un 31 % de los casos en mujeres²⁰.

Prácticamente, cualquier tipo de enfermedad cardiaca estructural puede predisponer a la EI, especialmente cuando el defecto resulta en turbulencias del flujo sanguíneo. La enfermedad reumática del corazón constituía la lesión predisponente en el pasado en un 37-76 % de las infecciones, y la válvula mitral estaba implicada en más de un 85% de los casos⁵. En los casos con afectación única de la válvula mitral, la afectación en las mujeres es superior a los hombres en una proporción 2 a 1. La endocarditis del lado derecho es rara y ocurre en menos del 10% de todos los casos que ocurren en pacientes con fiebre reumática. La proporción de casos relacionados con la enfermedad reumática del corazón ha continuado descendiendo a un 25 %, o aún menos en las últimas dos décadas²⁴.

La enfermedad cardiaca congénita, (en especial el *ductus arteriosus* patente, defectos en el septo ventricular, coartación de la aorta, válvula aórtica bicúspide, tetralogía de Fallot, y más raramente, estenosis pulmonar) es responsable en un 6–24 % de los casos⁵. La endocarditis es infrecuente en los defectos septales del *ostium secundum*, probablemente debido a que esta lesión implica un “shunt” de

baja presión con muy poca turbulencia. La válvula bicúspide congénita, erróneamente atribuida a la carditis reumática en el pasado ²⁵, actualmente se reconoce como una condición importante en pacientes mayores (especialmente en hombres), es la lesión predisponente en más del 20 % de los casos que aparecen por encima de los 60 años, y se asocia con un mal pronóstico, incluso aunque se realice un recambio valvular precoz ²⁶. El síndrome de Marfan, cuando se asocia a insuficiencia aórtica, también se ha asociado con la EI. Las reparaciones quirúrgicas de los defectos del septo ventricular disminuyen el riesgo de EI ²⁷.

Las lesiones cardíacas “degenerativas” (anillo mitral calcificado, lesiones calcificadas nodulares secundarias a enfermedad cardiovascular arteriosclerótica, trombos post-infarto miocárdico, y otras) representan la mayor importancia en el 30–40 % de los pacientes sin ninguna enfermedad valvular predisponente demostrable. La proporción real debida a estas lesiones es desconocida, pero aparecen con una incidencia creciente en los pacientes mayores. En una serie, las lesiones degenerativas estuvieron presentes en un 50% de los pacientes con endocarditis de válvula nativa por encima de 60 años ²⁸. En un análisis de 148 pacientes registrado en Londres desde 1970, la contribución de estas lesiones cardíacas degenerativas al desarrollo de la EI fue evidente ^{29, 30}. Los defectos estructurales cardíacos subyacentes fueron los siguientes: enfermedad reumática cardíaca, 39; defectos congénitos, 13; y válvulas normales o degeneradas, 65. De forma parecida, en otra serie de pacientes con EI solo un 31% presentaron enfermedad cardíaca conocida ³¹. Aunque un anillo mitral calcificado es claramente frecuente en mujeres mayores, esta lesión se complica con EI muy raramente (sólo en 3 de 80 casos en una serie) ³². Cuando se consideran separadamente los casos agudos de EI, más de un 50% no presentan una enfermedad cardíaca predisponente ¹⁰.

Muchas otras situaciones, como son la enfermedad cardíaca luética, fístulas arterio-arteriales, shunts o fístulas de hemodiálisis, electrodos de marcapasos intracardíacos, y prótesis intracardíacas pueden predisponer a la endocarditis. La endocarditis infecciosa suele afectar con mayor frecuencia a pacientes hospitalizados seriamente enfermos que son huéspedes inmuno-comprometidos y que son sometidos a procedimientos de acceso intravascular invasores (catéteres intravenosos, incluyendo las vías de monitorización de presión venosa central, vías

de nutrición, electrodos de marcapasos intracardíacos, y otros) ¹⁴. Otro grupo con un riesgo aumentado de EI son los adictos a drogas por vía intravenosa. En esta población, se da el problema añadido de un aumento en la prevalencia de EI en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana adquirida en adultos (VIH). Además, los adictos a drogas intravenosas son también un grupo de gran riesgo de presentar EI recurrente ^{5, 23}. Aunque se debate la contribución de los procedimientos invasores (como sigmoidoscopia o colonoscopia), la EI en válvula nativa también parece ser más frecuente en pacientes con enfermedad intestinal inflamatoria (en 6 de 213 pacientes en un estudio reciente) ³³.

Aunque la estenosis subaórtica hipertrófica idiopática o la hipertrofia asimétrica del septo interventricular no ha sido considerada una condición predisponente para la endocarditis bacteriana, en 1982 se comunicaron 32 de estos casos en la literatura ³⁴⁻³⁶. De siete episodios estudiados histológicamente, la infección se localizó en la válvula aórtica en tres, en la válvula mitral en dos, en ambas válvulas en un caso y en el endocardio subaórtico en otro paciente. Esta distribución está relacionada, con probabilidad, con la insuficiencia mitral asociada, debido al desplazamiento de la hoja anterior a causa de la arquitectura ventricular anómala y por la turbulencia de la corriente en chorro que afecta a la válvula aórtica distal a la obstrucción intraventricular. La edad de los enfermos que desarrollaron la endocarditis iba desde los 20 a los 66 años, y en la mayoría de los casos (70%) la enfermedad fue producida por estreptococos del grupo viridans. Aproximadamente un 5 % de los pacientes con estenosis subaórtica hipertrófica idiopática desarrollan EI ³⁶. La endocarditis infecciosa es más común en la subclase de pacientes con estenosis subaórtica hipertrófica que tienen formas hemodinámicamente graves, manifestadas por un pico muy elevado de presión sistólica y una alta prevalencia de síntomas. En un 36% de los pacientes con estenosis subaórtica hipertrófica complicada con una EI aparecen soplos nuevos, y este hallazgo físico se correlaciona con una tasa de mortalidad superior ³⁶.

También se ha establecido la asociación del síndrome de prolapso mitral y endocarditis. De 87 casos consecutivos de EI estudiados por la Universidad de Standford, 10 (11%) ocurrieron en pacientes con prolapso de válvula mitral bien establecido ³⁷. Estos 10 casos representaban más de un tercio de los 28 casos en

los cuales sólo la insuficiencia mitral fue el factor predisponente. Cuatro casos adicionales se presentaron en pacientes que no fueron estudiados por ecocardiografía o angiografía pero que tenían clínica evidente de síndrome de prolapso mitral. Por lo tanto, entre el 40 y el 50% de los casos de EI asociada con insuficiencia mitral aislada probablemente ocurrían en pacientes con síndrome de prolapso mitral. En una serie de 63 episodios de endocarditis sobre válvula nativa diagnosticados en Memphis de 1980 a 1984, el prolapso de válvula mitral fue la lesión predisponente más común en 23 (29%). En otro estudio ³⁸, 5 de 58 pacientes con prolapso de válvula mitral que fueron estudiados prospectivamente durante 9-22 años, desarrollaron endocarditis. Este síndrome debe sospecharse en pacientes con clic mesosistólico con presencia o no de soplo sistólico tardío. Esta situación es común y ha sido reconocida en un 0,5-20% de individuos sanos, en especial en mujeres jóvenes. Se ha hecho evidente que el prolapso mitral es sólo un componente de un síndrome en desarrollo. Esta lesión a menudo se asocia con hechos distintivos en mujeres ³⁹, como la enfermedad de von Willebrand u oftalmoplejia. Algunas de estas características pueden ser útiles para identificar pacientes con riesgo elevado para EI. Es importante hacer hincapié en que todos los 25 pacientes que desarrollaron EI en una válvula mitral con prolapso presentaban un soplo holosistólico, y ninguno presentaba clic aislado sin soplo ⁴⁰. El riesgo de EI parece aumentar en la subclase de pacientes con prolapso de válvula mitral que presentan redundancia valvular ²⁸. De cualquier manera, los pacientes con prolapso mitral presentan un riesgo claramente superior de padecer EI. Un estudio retrospectivo de casos y controles, demostró que estos pacientes tenían con respecto a los controles un riesgo superior para desarrollar EI, OR 8,2 (95 % IC: 2,4–28,4) ⁴¹. Parece ser que una vez que la EI se desarrolla en personas con prolapso de válvula mitral, los síntomas y signos son más sutiles y la tasa de mortalidad es menor cuando se compara con otros tipos de EI izquierda ⁴².

1.3. Patogénesis y Fisiopatología

Las observaciones *in vitro* y los estudios en animales de experimentación demostraron que el desarrollo de la EI, en la mayoría de las ocasiones, requiere la concurrencia simultánea de acontecimientos independientes entre sí, cada uno de los cuales está influido por una serie de factores separados.

La superficie valvular primero debe estar alterada para ofrecer un terreno adecuado para la adhesión y colonización bacteriana. Estos cambios en la superficie pueden estar producidos por diferentes disturbios locales incluyendo turbulencias sanguíneas. Estas alteraciones generan el depósito de plaquetas y fibrina y la formación de la llamada Endocarditis Trombótica No Bacteriana (ETNB). En esta situación las bacterias deben alcanzar esta lesión y colonizarla. Algunas especies parecen tener cierta ventaja en adherirse a las plaquetas y/o fibrina y con un bajo inóculo producir la infección. Tras la colonización, la superficie se cubre rápidamente con fibrina y plaquetas y así proporcionar un entorno favorable para el crecimiento bacteriano y de la vegetación.

1.3.1. Endocarditis Trombótica No Bacteriana

En 1852 Luschka sugirió que la endocarditis se producía cuando un émbolo séptico impactaba en los vasos de las válvulas cardiacas ⁴³.

Esta hipótesis se descartó, ya que las válvulas cardiacas están pobremente vascularizadas por su porción proximal, que no coincide con el asiento de la infección ⁴⁴⁻⁴⁶. Actualmente, ha quedado establecido que la colonización inicial ocurre en la superficie endotelial de la válvula. En los animales de experimentación la inyección intravenosa de bacterias no reproduce la EI si no se produce una alteración o lesión previa de la superficie valvular. Cuando un catéter de polietileno se introduce a través de la válvula aórtica en el conejo, la endocarditis se establece con celeridad al inyectar bacterias u hongos ^{47, 48}. El estudio microscópico de esta lesión inicial revela que el microorganismo está adherido a los depósitos de fibrina y plaquetas que tapizan el edema intersticial y la alteración celular que se ha producido en el traumatismo valvular ⁴⁹. Las fotografías de microscopía electrónica de barrido en fases iniciales de la enfermedad confirman la adhesión de microorganismos en las áreas de depósitos fibrino-plaquetarios ⁵⁰. Los organismos se recubren rápidamente de fibrina ⁵¹. Exceptuando al oposum y al cerdo, que desarrollan endocarditis sin la inducción de una alteración valvular experimental, ⁵²⁻⁵⁴ en otros animales y, probablemente el hombre, la alteración de la superficie valvular es un requisito previo para la colonización bacteriana. El primero en reconocer la importancia de estos depósitos de fibrina como un factor crítico que permite la

colonización bacteriana fue Angrist, lo que le llevo a sugerir el término de endocarditis trombótica no bacteriana ⁴⁶. Distintas formas de estrés exógeno causan estas lesiones experimentalmente, entre las que se encuentran la infección, los estados de hipersensibilidad, exposición al frío, altitud elevada simulada, estados con gasto cardiaco elevado, obstrucción linfática del corazón y manipulaciones hormonales ⁵². Todos estos procedimientos aumentan la susceptibilidad a la EI en los animales.

La endocarditis trombótica no bacteriana se ha detectado en pacientes con neoplasias (en especial carcinoma pancreático, gástrico o pulmonar) u otras enfermedades consuntivas crónicas, enfermedad cardiaca congénita o reumática ⁴⁵, uremia, enfermedades del tejido conjuntivo como el lupus eritematoso sistémico, tras la inserción de catéteres intracardíacos (ej.: Swan-Ganz), e incluso tras enfermedades agudas autolimitadas, lo que generalmente apunta a dos mecanismos patogénicos, hipercoagulabilidad y/o daño endotelial. La presencia de ETNB fue objeto de estudio en Japón, y se encontró en un 2,4 % de 3404 autopsias, en especial en individuos de edad avanzada con enfermedades consuntivas crónicas ⁵³. Como hecho destacable la ETNB estaba localizada con más frecuencia en el lado de baja presión de las válvulas cardíacas, a lo largo de la línea de cierre, la región más a menudo implicada en la EI. Una cuestión que se desconoce es si estas lesiones son siempre esenciales para el desarrollo de endocarditis en humanos.

1.3.2. Factores Hemodinámicos

La EI característicamente se sitúa en la superficie auricular de la válvula mitral y en la superficie ventricular de la válvula aórtica cuando se asocia a insuficiencia valvular. Rodbar ⁵⁵, indicó que estas localizaciones están relacionadas con un descenso en la presión lateral (presumiblemente con una perfusión de la íntima reducida) inmediatamente en el sentido de la corriente sanguínea del flujo regurgitante. Lesiones con turbulencia de alto grado (defectos septales pequeños con lesión de jet, estenosis valvulares con menor insuficiencia valvular) generan rápidamente condiciones que llevan a la colonización bacteriana, mientras que defectos con una mayor superficie (defectos mayores del septo ventricular), bajo flujo (defectos atriales del *ostium secundum*), o turbulencia atenuada (insuficiencia

cardiaca congestiva con fibrilación auricular) están muy raramente implicados en la EI. La curación de la EI conseguida solamente con ligadura de una fístula arteriovenosa o del *ductus* arterioso acentúan la importancia de los factores hemodinámicos. Una circulación hiperdinámica, como las creadas tras la inducción experimental de fístulas arteriovenosas en perros o fístulas y shunts en pacientes hemodializados, por sí misma puede llevar a EI por producir ETNB^{44, 52}.

El grado de alteración mecánica que se ejerce sobre la válvula afecta también a la localización de la endocarditis. En 1024 casos revisados de autopsias de EI en 1952, la incidencia de lesiones valvulares fueron las siguientes: 86 % mitral; 55 % aórtica, 19,6 tricúspide; y 1,1 % pulmonar. Esto se correlaciona con la presión que se ejerce sobre la válvula cerrada: 116, 72, 24 y 5 mm de Hg respectivamente⁵⁵.

1.3.3. Bacteriemia Transitoria

En el marco de un ETNB preexistente, la bacteriemia transitoria puede condicionar la colonización de estas lesiones y en el desarrollo de una EI⁵⁶. La bacteriemia transitoria acontece cuando una superficie mucosa ricamente colonizada por bacterias sufre un traumatismo, como son extracciones dentales u otros procedimientos odontológicos y procedimientos gastrointestinales, urológicos y genitales^{57, 58}. El grado de bacteriemia es proporcional al trauma ocasionado por el procedimiento y al número de organismos residentes en la superficie, y los organismos aislados reflejan la flora microbiana residente. La bacteriemia es con frecuencia de baja magnitud (<10 unidades formadoras de colonia/mL) y transitoria; el torrente circulatorio revierte estéril en menos de 15-30 minutos. Es de resaltar que en dos estudios en los cuales se tomaron hemocultivos antes del procedimiento odontológico, en un 9-10 % se detectó bacteriemia espontánea. Otros estudios han demostrado una frecuencia superior. Cuando se utilizaron filtros y técnicas anaeróbicas un 60-80 % de hemocultivos de personas sanas fueron positivos⁵⁸, no obstante el grado de bacteriemia fue bajo, aislándose 2-10 UFC/5 mL de sangre. Microorganismos no patogénicos, como *Propionibacterium acnes*, *Actinomyces viscosus*, *Staphylococcus epidermidis*, y otros *Actinomyces* o especies estreptocócicas fueron los agentes causales. Episodios frecuentes de bacteriemias silentes también han sido sugeridos por la detección de anticuerpos circulantes

frente a la flora oral residente y por la documentación de linfocitos T periféricos sensibilizados frente a la flora de la placa dental.

Otro factor crítico durante los episodios de bacteriemia transitoria es la sensibilidad del patógeno potencial a la actividad bactericida mediada por el complemento. Sólo los bacilos aerobios gram-negativos resistentes a la actividad bactericida del suero (ej.: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*) producen una EI experimental en conejos de forma consistente^{59, 60} y esta propiedad se encuentra en todos los aislamientos de casos de EI en humanos. Aunque se puede inducir EI en ratas con *E. coli* sensible a la actividad del suero, las bacterias son eliminadas rápidamente una vez retirado el catéter⁶⁰.

1.3.4. Interacción microorganismo–ETNB.

La capacidad de ciertos organismos de adherirse a ETNB es un paso inicial crítico en el desarrollo de endocarditis. Gould et al.,⁶¹ demostraron que organismos asociados frecuentemente con EI tales como enterococos, estreptococos del grupo viridans, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *P. aeruginosa* se adhieren in vitro más eficazmente a porciones de válvulas de perros normales de lo que lo hacen organismos no habituales en EI (*Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*). Además, *Staphylococcus aureus* y los estreptococos viridans producen EI más rápidamente de lo que lo hace *E. coli* en el modelo de EI en el conejo⁶¹. Esta observación se correlaciona con la frecuencia relativa con la cual estos organismos producen la enfermedad en el humano. La escasez de EI causada por bacilos aerobios gram-negativos también puede deberse a su sensibilidad al suero, como se ha mencionado previamente.

Las diferencias en la capacidad de causar endocarditis son evidentes incluso dentro de una misma especie. Hasta la fecha se han descrito 11 serotipos capsulares de *Staphylococcus aureus*; las cepas muy mucosas (ej.: serotipos 1 y 2) se aíslan raramente de muestras clínicas, mientras que los tipos 5 y 8 son responsables de aproximadamente el 75 % de los aislamientos. Sin embargo, las cepas mutantes que carecen de microcápsula tienen una dosis infectiva 50 (DI50) significativamente menor en el modelo de ETNB en ratas con respecto a las cepas salvajes originales. Por lo tanto, la expresión de cápsula puede atenuar la producción de endocarditis de

Staphylococcus aureus mediante el bloqueo de adhesinas en la superficie celular de la bacteria, aunque esta hipótesis aún requiere confirmación.

Estudios recientes, realizados con un modelo experimental de EI tras la extracción dentaria en ratas con periodontitis, el cual se aproxima a la secuencia patogénica en el hombre, también sugieren un papel importante de la adhesión bacteriana a la ETNB en los acontecimientos iniciales de la EI. Aunque los estreptococos del grupo viridans se aislaron con mayor frecuencia que los estreptococos del grupo G en los hemocultivos realizados 1 minuto después de la extracción, estos últimos causaron el 83% de los episodios de EI en el modelo descrito^{62, 63}. Esta propensión a causar EI se asoció con una adhesión *in vitro* a matrices de fibrina-plaquetas superior por parte de los estreptococos del grupo G⁶³.

La adhesión de estreptococos de la cavidad oral a ETNB puede depender de la producción de un polisacárido extracelular. Este polímero desempeña un papel esencial en la patogénesis de caries dental por *Streptococcus mutans*⁶⁴. Esto le permite al organismo adherirse firmemente a la superficie del esmalte dental. El aumento de la capacidad de adhesión a superficies inertes también puede ser importante en la EI. En un análisis de 719 infecciones estreptocócicas realizado en el Reino Unido, se encontraron 317 casos de EI (70). Las especies más frecuentes fueron *Streptococcus sanguis* (16,4 % de los casos) y *Streptococcus mutans* (14.2 %). Cuando se calculó la relación de endocarditis y bacteriemia sin endocarditis, se pudo predecir la capacidad relativa de una especie en particular para causar endocarditis. La relación fue de 14,2:1 para *Streptococcus mutans* mientras que para *Streptococcus pyogenes* la relación fue de 1:32. Esto sugiere que en la patogénesis de EI la producción de dextranos también puede ser un factor de virulencia.

También se ha estudiado *in vitro* el papel de los dextranos en la adhesión de los estreptococos orales a la ETNB mediante el uso de matrices fibrino-plaquetarias que simulan las que se producen en la ETNB. La cantidad de dextrano producido por los microorganismos en caldo se correlacionaba con la adhesión y se incrementaba con la presencia de sacarosa en el cultivo (la cual estimulaba la producción de dextrano) y disminuía por la adición al medio de dextranasa. La adición de dextrano exógeno a crecimientos de *Streptococcus sanguis* obtenidos en medios libre de sacarosa incrementaba la adhesividad. La producción de dextrano también se correlacionó de

forma directa con la capacidad de estos organismos para producir endocarditis *in vivo* en el modelo animal desarrollado en conejos ⁶⁵. La cepa de *Streptococcus sanguis* produjo endocarditis de una forma menos efectiva cuando se incubaba en presencia de dextranasa con respecto a las cepas de control, y una cepa que producía grandes cantidades de dextrano causó endocarditis de una forma más efectiva de lo que lo hizo una cepa que producía menos cantidades de dextrano. La adhesión de *Streptococcus mutans* a válvulas caninas con traumatismo también se incrementaba por la producción de dextrano ⁶⁶, un efecto dependiente de polímeros de elevado peso molecular ⁶⁷. Por lo tanto la formación de dextrano, o más adecuadamente, la producción de exopolisacáridos o de glucocálix, por los estreptococos orales puede constituir un factor de virulencia para el desarrollo de EI por parte de estos microorganismos ⁶⁸. Además, la síntesis *in vivo* continuada de exopolisacáridos durante la EI experimental se correlaciona con el tamaño de la vegetación y la resistencia al tratamiento antibiótico ^{69, 70}. La cuantificación de glucocálix de adhesión celular mediante análisis espectrofotométrico del triptófano entre los estreptococos viridans aislados de hemocultivos tiene un valor potencial como predictor de probabilidad de endocarditis ⁷⁰. No obstante, está claro que estreptococos no productores de dextrano pueden producir endocarditis en humanos y adherirse *in vitro* a la superficie de matrices fibrino-plaquetarias artificiales ⁷¹, lo cual sugiere que otras características de superficie microbiana intervienen en estos acontecimientos iniciales. Cualquiera que sea el papel que juegan los polisacáridos extracelulares en la adhesión microbiana, su presencia también puede retardar la terapia antimicrobiana en la endocarditis estreptocócica ^{69, 70, 72}.

Aunque la adhesión microbiana es un evento inicial crucial en la patogénesis de la EI, los receptores intracardíacos precisos son desconocidos y pueden diferir entre los diferentes organismos. La mayoría de los microorganismos se adhieren inicialmente a un constituyente de la ETNB, con evidencias, corroboradas por estudios recientes, que implican a la fibronectina como los receptores del huésped dentro de la ETNB ⁷³⁻⁷⁵. Cepas mutantes de *Staphylococcus aureus* y de *Streptococcus sanguis* con baja afinidad por la fibronectina presentan una capacidad disminuida para producir endocarditis en ratas, comparados con cepas con alta afinidad de unión a la fibronectina. Otros constituyentes normales de endotelios lesionados o de ETNB, como fibrinógeno, laminina, colágeno tipo 4 y otros, también

pueden servir como anclajes para bacterias circulantes ⁷⁶. Por ejemplo, *Streptococcus defectivus* (la especie aislada en el mayor número de casos de endocarditis causada por variantes nutricionales de estreptococos) se une a la matriz extracelular de fibroblastos y células endoteliales de una forma específica y saturable, mientras que *Streptococcus adjacens* y especies de estreptococos nutricionalmente variantes del serotipo III no se fijan a estas células ⁷⁷. También se ha documentado en un estudio la unión de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, y *Enterococcus faecalis* a esta matriz extracelular. Proteínas de anclaje a la laminina (ex.: una proteína de 145-kD encontrada en *Streptococcus gordonii* [anteriormente *S. sanguis* I]) se ha encontrado en la pared celular de organismos recuperados de pacientes con endocarditis ⁷⁸, y el nivel de expresión de proteínas parece estar regulado por la presencia de proteínas de la matriz extracelular. Otros organismos se pueden unir directamente, o bien ser ingeridos por las células endoteliales como acontecimientos iniciales ⁷⁹⁻⁸¹; esta secuencia parece importante en el inicio de la EI por *Staphylococcus aureus* en válvulas cardíacas "normales". A pesar de que la relación entre la unión específica entre moléculas de la superficie bacteriana y receptores celulares del huésped aún está por aclarar, constituye un área activa de investigación, ya que la inhibición de estas interacciones puede proporcionar nuevas estrategias de prevención.

Mediante el uso de la preincubación de los microorganismos con antibióticos también se ha estudiado la importancia de las características de adhesión en el desarrollo de la endocarditis. Tras la incubación, incluso a concentraciones subinhibitorias, muchas clases de fármacos son capaces de disminuir *in vitro* la adhesión a matrices fibrino-plaquetarias y a válvulas caninas lesionadas por parte de especies de estreptococos ⁸². Estudios en modelos animales han corroborado el significado de estas observaciones *in vitro*, ya que la preincubación de los microorganismos en concentraciones subinhibitorias de antibiótico previene el desarrollo de la endocarditis *in vivo* ^{83,84}. Esto tiene una importancia relevante en la quimioprofilaxis de la EI. En un estudio, concentraciones subinhibitorias de penicilina redujeron los ácidos lipoteicoicos de estreptococos, resultando en una menor adhesión a la ETNB y una capacidad alterada para producir EI *in vivo* ⁸⁵. Por lo tanto, los antibióticos pueden prevenir la EI por, al menos, dos mecanismos: 1) destruyendo bacterias y 2) inhibiendo la adhesión a ETNB ⁸⁶.

Desde que se conoce que las plaquetas, junto con la fibrina, son los mayores constituyentes de la ETNB, el papel de las plaquetas también se ha estudiado en la patogénesis de la endocarditis. Se ha demostrado que algunas cepas de bacterias son potentes estimuladoras de la agregación y secreción plaquetaria⁸⁷. En general, las cepas de estreptococos y estafilococos productoras de endocarditis agregan activamente las plaquetas más de lo que lo hacen otras bacterias que producen endocarditis con menor frecuencia. También se han encontrado agregados de plaquetas y bacterias en sangre periférica de pacientes con bacteriemia. En la actualidad se desconoce la importancia de estos agregados en la formación de la vegetación o, el efecto de la agregación en la tasa de reducción de organismos de la circulación. Las plaquetas, incluso en pequeño número, aumentan de manera considerable la adherencia *in vitro* de estreptococos orales a la fibrina⁶⁵. Estudios recientes⁸⁸, han demostrado que *Streptococcus sanguis*, una importante causa de EI, promueve la agregación de plaquetas y se adhiere a estos componentes sanguíneos mediante estructuras no polisacáridas sensibles a proteasas. Se ha sugerido la existencia de un receptor plaquetario para adhesinas de cepas de *Streptococcus sanguis*. Sin embargo, esta agregación plaquetaria por parte de estreptococos viridans, requiere la fijación directa a las plaquetas y componentes plasmáticos⁸⁹. Otros experimentos implican IgG en esta interacción específica entre estreptococos y plaquetas y sugiere que la activación de las plaquetas está mediada por un receptor Fc de 40000 kDa presente en la superficie plaquetaria⁹⁰.

Una vez ocurre la colonización de la válvula y se desarrolla una masa crítica de bacterias adheridas, la vegetación aumenta por el posterior depósito de plaquetas y fibrina y continúa la proliferación bacteriana. Recientemente se han identificado las complejas interrelaciones entre los factores responsables de la adhesión y agregación bacterias-plaquetas. Dos antígenos de superficie bacteriana confieren a *Streptococcus sanguis* la capacidad de inducir la agregación plaquetaria in vivo: (1) antígeno de clase I, el cual promueve la adhesión de *Streptococcus sanguis* a las plaquetas (adh+); y (2) la coexpresión de antígeno de clase II, el cual promueve la adhesión o la agregación de plaquetas (agg+). Se han identificado al menos nueve fenotipos adh/agg, lo cual refleja un intervalo de interacción con las plaquetas. Además, la inoculación intravenosa de cepas de *Streptococcus sanguis* agg+ a conejos con lesiones valvulares inducidas por catéter provoca unas vegetaciones

mayores, un curso clínico más grave, más lesiones macroscópicas en grandes órganos, y una mayor mortalidad, en relación con la inoculación de cepas agg- o agg+ pretratadas con fragmentos FAb específicos frente a los fenotipos con interacción con las plaquetas ⁹¹. La agregación plaquetaria inducida *in vivo* por *Streptococcus sanguis* parece ser un factor de virulencia determinante del desarrollo de la vegetación y del progreso de la enfermedad. Por otra parte, la producción de exopolisacáridos se correlaciona de forma inversa con la adhesión plaquetaria, además de inhibir la agregación ⁹², indicando que estas moléculas de superficie pueden potenciar la endocarditis en algunos niveles, pero no en otros.

Las plaquetas también pueden jugar un papel en la respuesta defensiva del huésped dentro de la vegetación. Se ha demostrado la secreción de proteínas microbidas (PMP o trombodefensinas) procedentes de los gránulos plaquetarios con actividad frente a algunos cocos gram-positivos tras la exposición a la trombina ⁷⁶. Aunque la capacidad de *Staphylococcus aureus* de adherirse y agregar plaquetas son propiedades relacionadas, la resistencia a PMP es una característica fenotípica independiente y un factor de potencial virulencia ⁹³. Las PMP son proteínas catiónicas de bajo peso molecular (8-10 UMA aproximadamente) y pueden actuar principalmente sobre la membrana o la pared celular de forma sinérgica con los antibióticos para matar bacterias. Las PMP también pueden mostrar actividad fungicida *in vitro* frente a algunas levaduras ⁹⁴. La resistencia microbiana a la actividad letal de las PMP puede contribuir a la patogénesis de la EI. Esta hipótesis se ve reforzada por la reducción en el peso de la vegetación y de la concentración bacteriana en conejos con endocarditis aórtica experimental por *Staphylococcus aureus* tratados con aspirina ⁹⁵.

Las microcolonias bacterianas se encuentran debajo de la superficie de la vegetación (variable, según la localización intracardíaca ⁵⁴, y la infiltración de células fagocitarias es mínima; por lo tanto en la vegetación se crea un ambiente de insuficiencia de las respuestas del huésped. Estas condiciones permiten un crecimiento bacteriano independiente, que lleva a poblaciones bacterianas relativamente elevadas de 10^9 - 10^{11} UFC/g de tejido. Se ha demostrado mediante autoradiografía que las bacterias ancladas en las profundidades de la matriz de fibrina tienen un estado de actividad metabólica reducido ⁹⁶. Estudios recientes

realizados por Yersin ⁹⁷ y otros, sugieren que cuando la válvula tricúspide está implicada, pero no la aórtica, la alteración de los mecanismos defensivos del huésped (ej.: neutropenia, corticosteroides) potencian la progresión de la enfermedad ⁹⁷. El papel de los granulocitos dentro de las vegetaciones es incierto. Cuando en los animales de experimentación con EI, se retrasa la formación de las vegetaciones con anticoagulantes, los microorganismos parecen dividirse en la superficie, los recuentos bacterianos son menores y la enfermedad clínica es más agresiva ^{98, 99}. Además, se ha sugerido que la fagocitosis de microorganismos por monocitos en la superficie o dentro de la vegetación genera la formación de tromboplastina tisular que actúa como un estimulante del depósito de fibrina y del crecimiento de la vegetación ¹⁰⁰. Sin embargo, pruebas más consistentes, sugieren que la activación de la coagulación, iniciada por factores tisulares,¹⁰¹ con la subsiguiente formación de trombo en el ámbito local, es responsable del inicio del crecimiento de la vegetación y su persistencia en la válvula cardíaca. Parece ser que algunos organismos (i.e., *Staphylococcus aureus*) inducen la producción de factores tisulares del endotelio, sin la necesidad de las citocinas del huésped ¹⁰².

1.3.5. Factores Inmunopatológicos

La endocarditis infecciosa estimula la inmunidad humoral y celular como se manifiesta por la hipergammaglobulinemia, esplenomegalia y la presencia de macrófagos en sangre periférica. La posibilidad de que anticuerpos preformados aumentarían la probabilidad para el desarrollo de EI se sugirió ante la aparición de EI espontánea en caballos que recibieron inmunización repetida con neumococos vivos ¹⁰³. Se sugirió que esos anticuerpos producían aglutinación bacteriana *in vivo* que aumentaban las oportunidades de colonización valvular. Los estudios en animales han sugerido un papel protector de los anticuerpos circulantes. Conejos inmunizados con estreptococos muertos por calor más adyuvante de Freund presentaron una DI50 media significativamente superior de la que presentaron controles no inmunizados tras la inducción del trauma valvular ¹⁰⁴. Otros autores han encontrado resultados similares con *Streptococcus sanguis*, *S. mutans*, y *S. pneumoniae* ^{105, 106}. En otros experimentos, la adhesión *in vitro* de *Candida albicans* a complejos de fibrina y plaquetas y la producción de endocarditis *in vivo*, se redujo por anticuerpos dirigidos frente a estructuras de la superficie celular (incluido el manano) ¹⁰⁷. Este

efecto puede depender del microorganismo infectante, así pues, ya que los anticuerpos frente a *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* no previenen el desarrollo de endocarditis en animales inmunizados o bien resultan en concentraciones bacterianas reducidas en la vegetaciones o en riñones,¹⁰⁸ quizá debido a la incapacidad del suero inmune de aumentar la opsonización y fagocitosis de estafilococos. Por lo tanto, el papel de los anticuerpos preformados en la patogénesis de la EI permanece aún sin establecer. De hecho, la aglutinación intravascular de bacterias puede disminuir la frecuencia de endocarditis debido a la reducción del número de microorganismos circulantes, pero no se transfiere protección cruzada a animales de control al inyectarles suero hiperinmune de conejos sensibilizados frente a *Streptococcus defectivus*¹⁰⁶. Además, los conejos inmunizados tratados con mostazas nitrogenadas pierden su capacidad de eliminar eficientemente *Streptococcus defectivus* de la circulación, un proceso que revierte parcialmente cuando se transfunden neutrófilos¹⁰⁹.

El factor reumatoide (anticuerpo IgM anti-IgG) se desarrolla en aproximadamente el 50 % de los pacientes con una EI de duración superior a 6 semanas¹¹⁰. El factor reumatoide se ha encontrado en el 24 % de los enfermos con endocarditis estafilocócica aguda (de duración inferior a 6 semanas) en el momento del ingreso, y el porcentaje aumentó al 40% si la fiebre persistió durante 2 semanas después del inicio de la terapia antibiótica¹¹¹. Más de 2/3 de los pacientes revirtieron a seronegativos tras 6 semanas de tratamiento, y 2 pacientes con un segundo episodio de EI aguda volvieron a desarrollar factor reumatoide precozmente. Los títulos se correlacionan con la hipergammaglobulinemia y van disminuyendo con el tratamiento. El factor reumatoide puede desempeñar un papel en el proceso de la enfermedad por el bloqueo de la actividad opsonizante de la Ig (por reacción con la fracción Fc), estimulando la fagocitosis, y/o acelerando el daño microvascular. El factor reumatoide, no se ha recuperado de los complejos inmunes de glomerulonefritis asociadas a EI¹¹². En la EI también aparecen anticuerpos antinucleares que podrían contribuir a las manifestaciones músculo-esqueléticas, fiebre de baja intensidad o dolor pleurítico¹¹³.

La endocarditis infecciosa, al igual que el paludismo, la esquistosomiasis, la sífilis, el “kala-azar”, y la lepra, se asocia con un estímulo antigénico intravascular constante;

por lo tanto, no es rara la síntesis de algunas clases de anticuerpos circulantes. Así en la EI se han descrito anticuerpos opsonizantes (IgG), aglutinantes (IgG, IgM), y fijadores de complemento (IgG, IgM), crioglobulinas (IgG, IgM, IgA, C3, fibrinógeno), varios anticuerpos frente a proteínas “heat-shock” y macroglobulinas ¹¹⁴⁻¹¹⁶. Usando células RAji sensibles o técnicas de desviación del C1q, se han detectado títulos elevados en prácticamente todos los enfermos con EI ¹¹⁷. Se encuentran complejos inmunes circulantes en una frecuencia elevada que está en relación con la duración prolongada de la enfermedad, manifestaciones extravalvulares, disminución del complemento y EI del lado derecho. Con un tratamiento eficaz, los niveles suelen hacerse indetectables. Los enfermos con EI y complejos inmunes circulantes pueden desarrollar una glomerulonefritis difusa que es análoga a la nefritis que se observa en las comunicaciones ventrículo-atriales infectadas ¹¹⁸. A lo largo de la membrana basal glomerular se depositan subepitelialmente complejos inmunes más complemento formando un patrón “lumpy-bumpy”. Las inmunoglobulinas recuperadas de estas lesiones han mostrado reacción cruzada con antígenos bacterianos ¹¹⁹. Además, dentro de los complejos inmunes circulantes se han detectado antígenos bacterianos ¹²⁰. Algunas de las manifestaciones periféricas de EI, como son los nódulos de Osler, también pueden derivar del depósito de complejos inmunes circulantes. Anatomopatológicamente, estas lesiones se asemejan a una reacción de Arthus aguda. Sin embargo, al haberse detectado cultivos positivos de punciones de nódulos de Osler, ¹²¹ se sugiere que quizá podrían deberse a émbolos sépticos en vez de depósitos de complejos inmunes. En algunas lesiones purpúricas difusas en EI, en los vasos sanguíneos dérmicos se han demostrado depósitos de complejos inmunes (IgG, IgM, y complemento) mediante inmunofluorescencia ¹²². Las determinaciones cuantitativas de la concentración de complejos inmunes séricos son útiles para calibrar la respuesta al tratamiento. El tratamiento eficaz lleva a un descenso precoz, con la desaparición eventual de los complejos inmunes circulantes ¹²³. Por el contrario, los fallos terapéuticos o las reactivaciones se caracterizan por la reaparición y aumento en los títulos de los complejos inmunes circulantes ¹²⁴.

1.4. Cambios patológicos

Corazón: Las vegetaciones de la EI generalmente se localizan a lo largo de la línea de cierre de la superficie atrial en las válvulas atrioventriculares o en la superficie ventricular de las válvulas semilunares. Las vegetaciones pueden ser únicas o múltiples, con un tamaño entre pocos milímetros a varios centímetros y apariencia macroscópica, consistencia y color variados. Microscópicamente, la lesión está constituida principalmente por fibrina, agregados plaquetarios y masas bacterianas; la presencia de neutrófilos y eritrocitos es rara. Puede aparecer destrucción de la válvula subyacente. Con tratamiento, la curación resulta en fibrosis y, ocasionalmente, calcificación. En las formas agudas la vegetación es mayor, más débil y friable y puede asociarse con supuración, más necrosis y menor reparación tisular que en las subagudas^{45, 125}. Esta infección puede llevar a la perforación de la hoja valvular, ruptura de las cuerdas tendinosas, del septo interventricular o de los músculos papilares. Con frecuencia, la endocarditis estafilocócica puede evolucionar con la presencia de abscesos en el anillo valvular, con fistulizaciones en el miocardio o en el saco pericárdico¹⁶⁴. También son comunes los aneurismas de las hojas valvulares o del seno de Valsalva. Las vegetaciones grandes pueden provocar una estenosis valvular. En las necropsias se encuentran frecuentemente lesiones como la miocarditis, infarto de miocardio y la pericarditis^{125, 126}. Los abscesos en el miocardio se encuentran en un 20% de las autopsias y se asocian principalmente con la endocarditis estafilocócica, con fiebre hética, aparición brusca de insuficiencia cardíaca congestiva y trastornos de la conducción. En un 40-60% de las autopsias realizadas se encuentran infartos de miocardio, a menudo sin antecedente de cambios diagnósticos en el electrocardiograma. En la EI es mucho más frecuente la presencia de pericarditis.

Los fenómenos embólicos son comunes en la EI. Entre un 70 y un 95% de los pacientes presentaban episodios embólicos clínicamente demostrables en la era preantibiótica, pero actualmente han descendido hasta un 15-35%. No obstante, aún se detectan evidencias anatomopatológicas de émbolos entre un 45 y un 65% de las autopsias, la mayoría de las veces se ven implicadas las circulaciones renal, esplénica, coronaria o cerebral. Los émbolos y los depósitos de complejos inmunes contribuyen a las manifestaciones extracardíacas de la EI y pueden afectar cualquier

sistema. Debe sospecharse endocarditis fúngica, endocarditis marántica, o mixoma intracardíaco cuando émbolos grandes obstruyen vasos de gran calibre.

En la EI infecciosa pueden encontrarse tres procesos patológicos que afectan a los riñones: abscesos, infarto, o glomerulonefritis. Los abscesos son infrecuentes, pero los infartos se detectan en un 56% de las autopsias ². El riñón suele ser normal de tamaño o ligeramente engrosado y se pueden apreciar petequias en la cápsula. Cuando se realizan biopsias renales durante la EI activa, la arquitectura renal es anormal en todos los casos ¹²⁷, incluso en ausencia de evidencias clínicas o bioquímicas de enfermedad renal. La glomerulonefritis “focal” se encuentra entre un 48 y un 88% de los casos pero es rara en la EI aguda. Es un proceso focal, local y segmentado, que se caracteriza por proliferación endotelial y mesangial, hemorragia, infiltrado neutrofilico, necrosis fibrinoide, formación semilunar y cicatrización fibrosa. La glomerulonefritis difusa se encuentra en un 17 a 80% de los casos y consiste en hiperplasia celular generalizada en todos los ovillos glomerulares. En la endocarditis debida a *S. epidermidis*, se encuentra una lesión menos frecuente, denominada glomerulonefritis membrano-proliferativa, que se caracteriza por una proliferación mesangial marcada y por la ruptura de la membrana basal glomerular. Es común detectar infiltración celular intersticial renal ¹²⁷.

Entre el 10 al 15% de los pacientes con EI presentan una glomerulonefritis por complejos inmunes similar a la que se observa en el lupus eritematoso ^{118, 119, 123, 124}. Entre las evidencias de la preponderancia de depósitos de complejos inmunes frente a fenómenos embólicos recurrentes, como principal mecanismo patogénico se incluyen las siguientes:

1. En las lesiones raramente se detectan bacterias.
2. La glomerulonefritis puede aparecer en presencia de EI derecha.
3. La glomerulonefritis es rara en la EI aguda, incluso cuando vegetaciones grandes y friables, causan formación de abscesos metastásicos diseminados.

4. Las tinciones inmunofluorescentes con anticuerpos anti-Ig revelan la distribución “lumpy-bumpy” típica que se ve en otras formas de nefritis por complejos inmunes.
5. En la glomerulonefritis difusa, mediante microscopía electrónica se observan depósitos electrón-densos subepiteliales, con IgG, IgM, IgA, o complemento que se pueden evidenciar mediante inmunofluorescencia.
6. Por elución de las lesiones se pueden obtener anticuerpos antibacterianos específicos ¹¹⁹.
7. Sólo se han encontrado anticuerpos antimembrana basal glomerular en un único caso de EI con nefritis.
8. La glomerulonefritis a menudo se acompaña de hipocomplementemia, con pruebas positivas de factor reumatoide.
9. Todas estas anomalías, se resuelven normalmente con terapia antimicrobiana adecuada, a medida que la concentración de complejos inmunes desciende.

Durante la EI, se desarrollan con frecuencia aneurismas micóticos, pero se detectan ocasionalmente meses o años tras haber efectuado un tratamiento antibiótico adecuado. Son más comunes en las infecciones por estreptococos del grupo viridans y están presentes entre un 10-15% de los casos de autopsias. Pueden surgir por cualquiera de los siguientes mecanismos: (1) invasión bacteriana directa de la pared arterial con subsiguiente formación de absceso o ruptura, (2) oclusión embólica séptica de los *vasa vasorum*, o (3) depósitos de complejos inmunes resultante en lesión de la pared arterial. Los aneurismas suelen ocurrir en los puntos de bifurcación. Se encuentran más frecuentemente en los vasos cerebrales (principalmente las ramas periféricas de la arteria cerebral media), pero también pueden originarse en la aorta abdominal, el seno de Valsalva, un ductus arteriosus

patente ligado, y las arterias esplénica, coronaria, pulmonar y mesentérica superior. Su incidencia real en la EI se desconoce, porque normalmente, los aneurismas micóticos son clínicamente silentes hasta que se produce su ruptura ¹²⁸.

En un tercio de los casos pueden presentarse episodios de embolia cerebral que afectan sobre todo a la arteria cerebral media y sus ramas ⁴⁵. De todas las causas de émbolos cerebrales, un 3% son secundarios a EI. En el contexto de la EI también se han descrito el infarto cerebral, arteritis, abscesos, aneurismas micóticos, hemorragia intracerebral o subaracnoidea, encefalomalacia, cerebritis y meningitis ¹²⁹. La transformación hemorrágica de un infarto isquémico debido a émbolos sépticos es el mecanismo más frecuente de aparición de hemorragia fatal intracerebral. En el transcurso de una EI ¹³⁰. La meningitis aguda purulenta es rara excepto en la endocarditis neumocócica, aunque microabscesos múltiples (cerebritis) debidos a *S. aureus* son relativamente comunes en la endocarditis estafilocócica aguda.

En un 44% de los casos de autopsia se han comunicado la presencia de infartos esplénicos, pero, con frecuencia, son clínicamente inaparentes ⁴⁵. También se ha descrito la formación y ruptura de abscesos esplénicos, pero son poco frecuentes. El engrosamiento esplénico es común y prácticamente todos los casos se asocian con hiperplasia de los folículos linfoides, un aumento de los folículos secundarios, proliferación de las células retículo-endoteliales y necrosis focal dispersa ¹²⁵. Ocasionalmente, se han observado casos de ruptura espontánea del bazo.

Las embolias pulmonares con o sin infarto, neumonía aguda, derrame pleural o empiema son comunes cuando está presente la EI derecha; los émbolos pueden ser de tipo blando o séptico.

La afectación cutánea es común. En un 20 -40% se encuentran petequias. Microscópicamente, los nódulos de Osler consisten en la proliferación de la íntima arteriolar que se extiende a capilares y vénulas y puede estar acompañada de trombosis y necrosis. Un infiltrado perivascular difuso, compuesto de neutrófilos y monocitos, envuelve los vasos dérmicos. También se ha demostrado la presencia de complejos inmunes en los vasos dérmicos. Las lesiones de Janeway están formadas por bacterias, infiltrado neutrofilico, necrosis, y hemorragias subcutáneas. Las

lesiones de Janeway se deben a émbolos sépticos y en el estudio histológico muestran abscesos subcutáneos ¹³¹.

1.5. Etiología de la Endocarditis Infecciosa

Una gran cantidad de microorganismos se han implicado en la EI, pero los estreptococos y estafilococos son responsables del 80 al 90% de los casos en los que se realiza la identificación. Los agentes etiológicos más frecuentes están descritos en la Tabla I.

	Válvula nativa		Válvula protésica		Marcapasos Y desfibriladores	Total
	Pob. general	Adictos D V P	Precoz	Tardía		
Estafilococos	126 (21%)	289 (71%)	51 (77%)	31 (27%)	47 (85%)	544 (44%)
<i>S. aureus</i>	92	283	11	17	15	418
estafilococos coagulasa neg.	34	6	40	14	32	126
Estreptococos	288 (48%)	69 (17%)	4 (6%)	47 (40%)	2 (4%)	410 (33%)
Grupo viridans	209	62	2	34	2	309
<i>S. bovis</i>	28	3	-	4	-	35
Neumococo	16	1	-	2	-	19
Enterococos	49	6	1	12	-	68 (5,5%)
Grupo HACEK	21	-	1	6	-	28 (2%)
Otros BGN	21	2	2	-	3	28 (2%)

	Válvula nativa		Válvula protésica		Marcapasos Y desfibriladores	Total
	Pob. general	Adictos D V P	Precoz	Tardía		
Fiebre Q	9	-	-	1	-	10 (1%)
Otros gérmenes	14	8	2	5	-	29 (2%)
Hongos	4	5	2	1	-	12 (1%)
Polimicrobiana	6	14	1	4	3	28 (2%)
Cultivo negativo	55	14	2	9	-	80 (6,5%)
Total episodios	593 (48%)	407 (33%)	66 (5%)	116 (9,5%)	55 (4,5%)	1237

Tabla I. Microorganismos aislados en 1237 episodios de endocarditis infecciosa diagnosticados en los hospitales Clínic Universitari y Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona desde 1975 hasta 1998. (Tomado de Farreras Rozman 14^a edición. Editorial Harcourt. 2000. Madrid).

2. Tratamiento médico de la endocarditis infecciosa

Además del tratamiento antimicrobiano, la endocarditis infecciosa requiere de unas medidas terapéuticas generales ¹³² (5EI, Wilson, 1982), que abarcan un correcto diagnóstico microbiológico, el control del tratamiento, la detección y el tratamiento de las complicaciones, el control de la anticoagulación si se precisa y el seguimiento prolongado del paciente tras el alta.

Es importante conocer el microorganismo causal, ya que así se puede escoger el tratamiento idóneo, para ello, como ya se ha visto anteriormente, es importante la realización de hemocultivos ¹³³. Además del diagnóstico etiológico, dentro de los diferentes estudios microbiológicos es importante determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM). Los estudios de poder bactericida del suero se reservan para pacientes inmunodeprimidos, microorganismos resistentes, o cuando no existan tratamientos bien definidos. Los estudios de sinergia son importantes en los casos de endocarditis enterocócica y también en las mismas situaciones en que se recomienda estudiar el poder bactericida.

Las concentraciones de antimicrobianos deben medirse periódicamente en el curso de la endocarditis, con el fin de prevenir la toxicidad y mantener concentraciones eficaces.

2.1. Principios generales del tratamiento antimicrobiano

La endocarditis infecciosa es difícil de curar y los estudios en los modelos animales han permitido establecer varias premisas ¹³⁴⁻¹³⁷:

1. Es esencial que los antibióticos sean bactericidas.
2. Los antibióticos deben ser administrados por vía parenteral y con un intervalo adecuado para obtener concentraciones terapéuticas.
3. El tratamiento debe ser prolongado.
4. En algunas situaciones deben utilizarse asociaciones sinérgicas.

Otros aspectos que pueden influir en el tratamiento antimicrobiano de la endocarditis son:

- La difusión de los antibióticos en las vegetaciones
- La formación de biocapas, con bacterias englobadas en matrices de exopolisacáridos.

3. Modelo de endocarditis bacteriana en el conejo

3.1. Antecedentes del modelo

Desde la primera comunicación de un modelo animal en 1885 ¹³⁸, se han ensayado diversos modelos de endocarditis infecciosa en una variedad de animales: perros, caballos, cerdos, opossum, ratas y conejos ⁴³. Los investigadores iniciales se apercibieron de la capacidad del trauma valvular, u otras manipulaciones, para facilitar que las bacterias inyectadas colonizaran las válvulas cardiacas. El modelo animal en el conejo, tal y como se utiliza hoy en día, está basado sobre el modelo descrito por Garrison y Freedman, ¹³⁹ fácil y reproducible. Este modelo, que utiliza un catéter de polietileno para inducir lesión valvular, fue modificado por Durack y Beeson ⁴⁸, Sande e Irwin ¹⁴⁰ y otros ^{141, 142}.

3.2. Ventajas y desventajas del modelo

El modelo de endocarditis en el conejo ha demostrado producir una infección en animales que reproduce muy aproximadamente las características de la endocarditis infecciosa en el hombre. No obstante, existen algunas diferencias entre la enfermedad en el humano y en el animal y se debe ser muy cauteloso a la hora de extrapolar los resultados en animales a la terapia de pacientes humanos. Primero, la lesión valvular inducida por el catéter de polietileno es patofisiológicamente muy diferente de las condiciones que predisponen al hombre a la endocarditis infecciosa. Además, en la mayoría de los estudios el catéter se deja en su emplazamiento hasta que el animal es sacrificado. La presencia de este cuerpo extraño mimetiza la situación clínica de los pacientes con endocarditis de válvula prostética más que la infección sobre válvula nativa. También, el tamaño del inóculo necesario para producir infección en animales y la subsiguiente bacteriemia es superior al número de bacterias circulantes causantes de endocarditis en humanos. La puerta de entrada intravascular es rara en humanos. Asimismo, la bacteriemia que se origina por procedimientos invasores en humanos es a menudo polimicrobiana, a diferencia del modelo animal que normalmente se infecta con un solo microorganismo. En el modelo experimental, no se prueban más de dos o tres cepas de especies de

bacterias y la extrapolación a las otras cepas de la especie debe ser muy cautelosa. Por este motivo, la elección de la bacteria infectante debe ser representativa del problema clínico que se está investigando. Finalmente, la infección inducida en animales probablemente es más severa y más aguda que la enfermedad humana, como se comprueba por la elevada mortalidad si no se trata a los animales¹⁴³.

Comparado con el modelo en rata, el modelo en el conejo presenta dos grandes ventajas. La primera, es que el tamaño de las vegetaciones obtenidas en el conejo es superior al de las ratas. Esto es de gran importancia, ya que el tamaño de la vegetación influye claramente en la difusión de los antibióticos. Segundo, la mayor población bacteriana presente en las vegetaciones de los conejos permite la selección de mutantes resistentes durante el tratamiento¹⁴⁴. Por otro lado, los conejos son más caros y más difíciles de manejar que las ratas. Por estas razones, el modelo de endocarditis en conejo es más apropiado para los estudios terapéuticos y el modelo en ratas para los estudios de profilaxis.

3.3. Descripción de los distintos modelos.

Uno de los primeros modelos de endocarditis aplicables, fue desarrollado a finales de la década de 1950 e inicio de 1960 por Walker y Hamburger^{145,146}. Inicialmente se inducía una insuficiencia aórtica mediante la escisión de un disco de 3 mm de diámetro en las valvas de la válvula aórtica, con un catéter de biopsia que se introducía vía la arteria aorta, mediante una toracotomía. Transcurridas 3 semanas se inyectaba por vía intravenosa 10^7 - 10^8 UFC/mL de *S. aureus*. Un 55-60% de los animales desarrollaban endocarditis a los 4-12 días, lo que se traducía en fiebre, letargia y bacteriemia. Los animales morían sin tratamiento y la endocarditis era demostrable en la autopsia por cultivo e histología.

Keys y Sapico^{147, 148}, también utilizaron el modelo de endocarditis en perros para evaluar la sinergia de la combinación de penicilina y estreptomina en el tratamiento de la endocarditis enterocócica. En lugar de toracotomía manipulaban la aguja que causaba lesión valvular mediante un catéter que se introducía por la arteria carótida. A los animales se les inoculaba con 10^7 UFC/mL de *E. faecalis* y aproximadamente el 85 % desarrollaban endocarditis. La eficacia del tratamiento se evaluaba mediante hemocultivos cuantitativos antes y después del tratamiento.

Estos modelos tenían el inconveniente de trabajar con animales de gran tamaño. No obstante, los resultados quizás eran más extrapolables a los humanos porque las farmacocinéticas de los antimicrobianos en estos animales eran más parecidas a las que se obtenían en humanos.

El modelo de endocarditis en conejos fue desarrollado a principios de 1970 por Garrison y Perlman^{139, 149, 150} y posteriormente fue modificado por Sande e Irwin¹⁴⁰, Durack y Beeson^{48-50, 96} y Gutschik^{141, 142, 151-155}. También, Santoro y Levison¹⁵⁸ demostraron que la rata podía ser utilizada para el estudio de la endocarditis experimental por cateterismo. Este modelo ofrecía las ventajas del coste y cuidado diario del animal sobre el modelo en conejos. Por otro lado, Imataka et al.,^{157, 158} desarrollaron un modelo experimental de endocarditis por estreptococos del grupo viridans en conejos a los que previamente se les provocó un prolapso de válvula mitral, mediante la estimulación vagal cervical.

Overholser et al.,⁶³ desarrollaron una adaptación del modelo experimental de endocarditis inducida por cateterización para investigar la importancia de la enfermedad periodontal preexistente. Provocaban la enfermedad periodontal en ratas mediante una dieta alta en sacarosa y tras la manipulación de los dos primeros molares mediante ligadura con seda.

Grogan et al.,¹⁵⁹ desarrollaron en 1980 un modelo de endocarditis protésica tricúspide en terneros. La endocarditis protésica precoz se producía tras la inyección de 10^2 - 10^3 UFC/mL de *S. aureus* en la prótesis durante la intervención quirúrgica. Por el contrario, la endocarditis protésica tardía se producía por inoculación de 10^7 UFC/mL de *S. aureus* a los dos meses de implantación de la válvula. Este modelo se puede utilizar para estudiar problemas técnicos de reemplazo de válvulas protésicas, para valorar la profilaxis y el tratamiento y para observar interacciones del microorganismo, células del huésped y el cuerpo extraño. La necesidad de utilizar un animal caro, de difícil alojamiento y de utilizar técnicas quirúrgicas muy sofisticadas son las mayores desventajas de este modelo.

El modelo de endocarditis en conejos es el más utilizado para los estudios terapéuticos y fisiopatológicos¹⁴³. Este modelo, de forma similar al desarrollado en perros y ratas, se basa en la colonización y posterior infección de una lesión en la

válvula aórtica producida por un catéter que se ha introducido en el ventrículo izquierdo a través de la arteria carótida derecha, y es recomendable utilizar un sistema de monitorización de presión arterial para confirmar la entrada en el ventrículo.

A los pocos minutos ya se puede detectar una lesión valvular microscópica, que a las 24 h ya es visible macroscópicamente y que está formada por trombos de plaquetas y fibrina. Estas lesiones son muy susceptibles de ser colonizadas por microorganismos, que pueden inocularse a través del catéter o bien por vía intravenosa. En el primer modelo desarrollado por Garrison y Perlman,^{139, 149, 150} colocaban un catéter que, previamente había sido rellenado con una suspensión de *S. aureus*. Con la intención de aproximarse más a la patogenia de la endocarditis humana, Durack y Beeson^{48-50, 96}, modificaron el modelo de Garrison inoculando a los animales por vía intravenosa, a través de una vena marginal de la oreja, lo cual producía una bacteriemia transitoria.

Después de la adhesión de las bacterias a las matrices fibrino-plaquetarias presentes en las válvulas, se produce la infección por replicación de los microorganismos en el interior de la vegetación. La cuantía de bacterias a inocular depende de la especie e incluso de la cepa a estudiar. Inóculos de 10^3 - 10^4 UFC/mL de *S. aureus* pueden producir infección¹⁴⁹, mientras que son necesarias más de 10^5 UFC/mL de estreptococos del grupo viridans¹⁶⁰, o más de 10^8 UFC/mL de *S. epidermidis*¹⁶¹, para que se produzca endocarditis en los animales. Una vez se han adherido las bacterias a las lesiones trombóticas, se multiplican y se acelera el depósito de plaquetas y fibrina, lo que tiene como consecuencia el aumento del tamaño de la vegetación. La secuencia de colonización y multiplicación de las bacterias en la vegetación fue descrita por Durack⁵⁰, aproximadamente a la media hora de la inoculación intravenosa de 10^7 UFC/mL de *S. sanguis* ya se encuentran microorganismos en la superficie valvular. A las 6 horas ya se observan microcolonias y a las 24 h la concentración bacteriana en la vegetación oscila entre 10^7 y 10^{10} UFC/g de tejido valvular. Las vegetaciones crecen por la continua adhesión de microorganismos circulantes. Estos microorganismos adheridos a la superficie de la vegetación estimulan la activación de tromboplastina tisular, que activa el proceso de coagulación y el depósito de fibrina y plaquetas¹⁰¹.

Mediante técnicas de autoradiografía, Durack y Beeson⁹⁶ demostraron la existencia de 2 poblaciones bacterianas diferentes en el interior de la vegetación. La primera se encuentra en la periferia, está en fase de multiplicación exponencial, provoca bacteriemia y es la responsable del aumento de tamaño de la vegetación. La segunda, en el interior de la vegetación, está metabólicamente inactiva y, por lo tanto, no hay replicación celular.

La valoración de la existencia o no de endocarditis en los animales de experimentación se fundamenta en la positividad de hemocultivos tomados antes de iniciarse el tratamiento con antibióticos.

La persistencia o no del catéter en posición intracavitaria tiene gran influencia en la patogenia y evolución de la endocarditis experimental en conejos. Perlman y Freedman¹⁵⁰, demostraron que la endocarditis izquierda o derecha por *S. aureus* en conejos seguía activa mientras se mantenía el catéter. El curso de la infección se modificaba cuando los catéteres se retiraban. Este cambio era más acentuado en aquellos animales a los cuales se les provocaba endocarditis derecha, puesto que el 83% de las vegetaciones se esterilizaban en una semana, mientras que esto ocurría en el 57 % de los animales con endocarditis izquierda.

Freedman y Valone¹⁶², también hallaron que para que la infección se estableciera era importante el tiempo transcurrido entre la retirada del catéter y la producción de la bacteriemia. Si la inoculación de los animales se realizaba a las 24 h de la retirada del catéter, la infección se desarrollaba en el 95 % de los animales. Por el contrario, sólo se infectaban el 56% de los animales si la retirada se realizaba de 8 a 15 días después. Durack et al.,⁴⁹ también sugirieron que la susceptibilidad de los conejos a desarrollar la infección disminuía al aumentar el período entre la cateterización y la producción de bacteriemia. Pujadas¹⁶³, demostró que la endotelización del catéter y de las vegetaciones estériles, que se producía entre los 2-3 meses después de la inserción del catéter, protegía a los animales de desarrollar endocarditis tras ser inoculados con *Streptococcus mitis* por vía intravenosa. La presencia del catéter aumenta la gravedad de la infección y la dificultad para esterilizar las vegetaciones con el tratamiento, aunque este hecho no influye de igual manera en la eficacia de diferentes pautas antibióticas. Pelletier et al.,¹⁶⁴ en estudios de endocarditis experimental por *S. sanguis* comprobaron que la retirada del catéter tenía mucho

mayor efecto en el tratamiento con penicilina que con la combinación de penicilina y estreptomina.

Otro factor que influye en la evolución de la endocarditis experimental es la localización de la infección en el ventrículo derecho o izquierdo. En los comienzos de 1960 ya se observaron diferencias en la gravedad del proceso al comparar la infección estafilocócica producida en el lado derecho del corazón con la endocarditis izquierda^{139, 149, 150}. Mientras que los animales que desarrollaban endocarditis izquierda morían dentro de las dos semanas de inducida la infección, los animales con endocarditis derecha sobrevivía a este período de tiempo. Asimismo, observaron que la concentración bacteriana en las vegetaciones derechas era mucho menor que la de las vegetaciones izquierdas. Por otra parte, la esterilización de las vegetaciones derechas, después de la retirada del catéter, ocurre con mayor frecuencia que en las vegetaciones izquierdas. Con posterioridad, Durack⁴⁹ halló resultados similares en conejos con endocarditis por estreptococos del grupo viridans. Los factores propuestos para estas diferencias fueron que el crecimiento bacteriano en el lado izquierdo estaba favorecido por la mayor concentración de O₂ a este nivel y la posibilidad de que los factores de defensa del huésped estuvieran potenciados en el lado derecho del corazón. Bayer et al.,^{165, 166} También postularon que la mayor pO₂ en las cavidades izquierdas del corazón era el factor más importante para el mayor número de unidades formadoras de colonias de *Pseudomonas aeruginosa* que se recuperaban de las vegetaciones del ventrículo izquierdo.

El tiempo transcurrido entre la infección y el inicio del tratamiento también influye en la eficacia de los antibióticos usados para la terapéutica de la endocarditis experimental. Cuanto más pronto se inicie el tratamiento, mejores resultados se obtienen, incluso con fármacos sin eficacia clínica. Carrizosa et al.,¹⁶⁷ realizaron un estudio en el que se efectuaba el tratamiento de la endocarditis enterocócica experimental en conejos a diferentes períodos de tiempo después de la infección. Cuando se iniciaba a las 6 h de inducida la infección la penicilina sola curaba a todos los animales en 3 días. Si se llevaba a cabo a las 72 h, era totalmente inefectiva, incluso con pautas de 7 días de duración. La eficacia de la combinación de penicilina

y estreptomina, gentamicina o sisomicina también disminuía al aumentar el tiempo transcurrido entre la infección y el inicio del tratamiento.

Los antibióticos utilizados se administran por vía intramuscular si no es que se precisa el uso de la vía intravenosa, como en el caso de la vancomicina. La dosis, el intervalo de dosificación y la duración del tratamiento varían dependiendo del antibiótico usado, el microorganismo a estudiar y la hipótesis de trabajo. Para que las conclusiones puedan extrapolarse a la clínica humana es importante que la farmacocinética de los antibióticos utilizados sea lo más parecida posible a la que presenta en humanos. Generalmente, la dosis debe relacionarse con las concentraciones séricas y los intervalos de dosificación con la vida media del fármaco. Habitualmente la vida media del fármaco es menor en animales, ya que el metabolismo es mayor. Para soslayar esta situación se han desarrollado los modelos animales de farmacocinética humanizada.

La eficacia terapéutica se puede evaluar mediante distintos parámetros: cultivos cuantitativos de las vegetaciones, riñones, proporción de hemocultivos positivos en los distintos días de tratamiento (porcentaje de erradicación de la bacteriemia), porcentaje de esterilización de las vegetaciones, recidivas después de un tratamiento y aparición de resistencias antibióticas durante el mismo. En el caso de utilizar la concentración bacteriana de las vegetaciones como índice de la eficacia terapéutica, los animales son sacrificados después de un determinado número de tratamientos, las vegetaciones de la válvula se escinden de manera aséptica y se cultivan cuantitativamente. Las vegetaciones pueden estar también en la raíz de la aorta y en la pared ventricular, pero Francioli et al.,¹⁶⁸ demostraron que la concentración bacteriana de estas lesiones era menor, a pesar de situarse a escasos milímetros de la válvula aórtica. Por convención, los resultados se expresan como el logaritmo decimal de las UFC por gramo de vegetación (\log_{10} UFC/g), aunque el peso total raramente sobrepasa 0,1-0,15 g.

Las comparaciones estadísticas entre los diferentes grupos de tratamiento se llevan a cabo, a menudo, utilizando el método de la t de Student. Esta prueba estadística puede indicar de manera falsa ausencia de diferencia (error tipo II) cuando los datos no siguen una distribución normal y la varianza es elevada. Una prueba como la suma de clasificaciones de Mann-Witney es más apropiada en estos casos. Cuando

se comparan tres o más grupos debe utilizarse la prueba de análisis de la varianza. No deben realizarse comparaciones múltiples con la prueba de t de Student a menos que se realicen correcciones de Bonferroni o Scheffée. La valoración de la eficacia por curación o recaída, tasa de erradicación de la bacteriemia o de vegetaciones estériles puede realizarse mediante la prueba de X^2 para comparaciones apareadas o múltiples.

Dadas las diferencias en la patogenia, curso de la infección y farmacocinética de los antibióticos en los animales de laboratorio respecto a los humanos, es arriesgada la extrapolación de los resultados a los humanos, para responder a los problemas planteados en clínica. La eficacia terapéutica de un determinado régimen sólo debe ser interpretada tras la comparación de los resultados obtenidos con una pauta terapéutica con eficacia clínica demostrada.

3. 4. Principios generales del tratamiento de la endocarditis, aprendidos del modelo animal

A lo largo del tiempo se han ido estableciendo una serie de principios generales del tratamiento de la endocarditis infecciosa a partir de los resultados obtenidos en los estudios con el modelo animal.

1. Para obtener una curación absoluta es imprescindible el uso de antibióticos que actúen de forma bactericida. Los estudios histológicos han demostrado la ausencia de macrófagos y polimorfonucleares en el seno de la vegetación⁹⁶. Es decir, la endocarditis infecciosa es una infección que acontece en un área donde las defensas del huésped están disminuidas. Esto implica que son necesarios antibióticos que eliminen la bacteria para lograr la esterilización de las vegetaciones. Los antibióticos que inhiben el crecimiento bacteriano (bacteriostáticos) pueden esterilizar los hemocultivos y disminuir la fiebre, pero cuando se retira el tratamiento antibiótico, se produce un recrecimiento bacteriano que lleva a la recaída de la infección. Así, por ejemplo, la tetraciclina resultó ineficaz en el tratamiento de la endocarditis infecciosa experimental por estreptococos del grupo viridans¹⁶⁹. También se ha demostrado la existencia de antagonismo entre agentes bacteriostáticos y bactericidas en el modelo de endocarditis estreptocócica, en este sentido, la

asociación de penicilina y cloranfenicol resultó menos eficaz que el tratamiento con penicilina sola en el tratamiento de la endocarditis estreptocócica experimental ¹⁷⁰. En relación con estos datos se ha evaluado la utilidad del poder bactericida del suero (PBS) como un supuesto índice de eficacia durante el tratamiento antibiótico. El PBS es el efecto del suero del paciente junto con los antibióticos administrados frente al microorganismo productor de la endocarditis infecciosa aislado de los hemocultivos. Los modelos animales demuestran una correlación directa del PBS, con títulos de 1/8 a 1/16, y el éxito terapéutico ¹⁷¹⁻¹⁷³. En función de estos resultados, algunos autores han recomendado que el PBS en el momento del valle (concentración de los antibióticos previa a la administración de la dosis) debe ser mayor o igual a 1/8 durante el tratamiento de la endocarditis infecciosa en humanos ¹⁷⁴. A pesar de ello, no existe concordancia en la literatura médica respecto al valor pronóstico del PBS en el tratamiento de la endocarditis infecciosa ^{175, 176}. Algunos autores consideran que el PBS por sí solo no puede predecir el éxito o fracaso terapéutico. El PBS puede ser útil clínicamente para monitorizar concentraciones de antibiótico en suero y para demostrar que una determinada pauta antibiótica es bactericida.

2. La eliminación de los microorganismos durante el tratamiento de la endocarditis infecciosa es mucho más lenta que *in vitro*, lo que se debe a una serie de factores: a) la concentración bacteriana en la vegetación es extraordinariamente alta ($> 10^8$ UFC/g vegetación), mucho mayor que la concentración bacteriana utilizada en los estudios de sensibilidad *in vitro*. Debido a esto, la actividad metabólica bacteriana en el interior de la vegetación está disminuida respecto a los cultivos en caldo ^{48, 96} y b) varios autores ^{177, 178} han demostrado que la penetración de los antibióticos en el seno de la vegetación está disminuida o alterada.

Estos factores explican, parcialmente, la menor susceptibilidad bacteriana *in vivo* a muchos antimicrobianos, fundamentalmente de los betalactámicos, cuya actividad es mucho mayor ante los microorganismos que se multiplican rápidamente. También podría explicar la aparición de recaídas cuando el período de tratamiento es corto

¹⁷⁹. Por tanto la duración del tratamiento de la endocarditis infecciosa debe ser mayor que la de otras infecciones.

3. El porcentaje de letalidad bacteriana *in vitro* producido por los antibióticos solos o en combinación puede predecir la erradicación de las bacterias de la vegetación infectada *in vivo*. La combinación de un betalactámico y un aminoglucósido, si actúan de manera sinérgica *in vitro* por curvas de letalidad, esterilizará más rápidamente las vegetaciones infectadas que el betalactámico solo.

4. Farmacocinéticas en los animales y humanos

4.1. Generalidades

Los perfiles farmacocinéticos de los antibióticos en los animales de experimentación a menudo, pueden diferir notablemente con los humanos. Esto se debe a diferencias entre las especies en la absorción, distribución, metabolismo y excreción^{180, 181}.

Estos son parámetros críticos a tener en cuenta, no solo en estudios de seguridad, sino también cuando se estudia la eficacia clínica potencial de nuevos antimicrobianos o la evaluación de terapias alternativas en la indicación clínica.

En general, los antibióticos se eliminan más rápido en animales que en humanos^{180, 182-184}. Estudios de diversos autores han establecido categóricamente, en la infección experimental, la existencia de relación entre las pautas de dosificación y la eficacia^{181, 185-189}. Es lógico pues, llegar a la conclusión de que ajustando las pautas de dosificación en los animales de experimentación se puede compensar la eliminación más rápida de los antibióticos y conseguir así simular los parámetros farmacocinéticos humanos en el suero de los animales de laboratorio.

Las técnicas actualmente disponibles, que permiten modificar las curvas de concentración-tiempo en suero caen dentro de tres categorías:

- Modificar las pautas de dosificación
- Reducir la tasa de eliminación con la coadministración
- Modificar las velocidades de infusión

Aunque los tres métodos se han empleado con éxito, quizás estas aproximaciones no son útiles para todos los antibióticos; por ejemplo, el metabolismo y los metabolitos producidos pueden ser diferentes según las especies¹⁹⁰, como también pueden diferir la fijación a proteínas séricas y tisulares^{187, 191}.

Estas técnicas son complejas y requieren más recursos que los métodos de estudio estándar que se emplean para seleccionar antibióticos. Además, como se requiere el conocimiento previo de la farmacocinética en humanos, su empleo es más adecuado

para compuestos ya en uso o en fases avanzadas de desarrollo. Estas técnicas, necesariamente, deben emplearse en infecciones experimentales que tengan la suficiente duración que permitan evoluciones predecibles y reproducibles, como sería el caso del modelo de endocarditis bacteriana experimental en conejos.

En este orden de cosas, la simulación de cinéticas humanas llevaría a comparaciones más extrapolables, no sólo en lo concerniente a la eficacia relativa entre antibióticos en infecciones experimentales, sino entre diferentes pautas de dosificación.

4.2. Modificación de las pautas de dosificación

Hacia 1950, Eagle y colaboradores ^{192, 193}, demostraron en ratas y ratones que la erradicación de bacterias de los lugares de infección y la supervivencia dependía en gran medida de pautas de dosificación apropiadas. Más tarde, Hunter et al., ¹⁹⁴ en un modelo de infección del muslo por *Pseudomonas aeruginosa* en ratones, demostraron la importancia de seleccionar el intervalo adecuado de dosificación. Gerber et al., ¹⁹⁵ trabajando con *P. aeruginosa* en el mismo modelo y en otro de infección intraperitoneal, compararon los efectos de las farmacocinéticas en el animal y en humanos en relación con la eficacia de los antibióticos betalactámicos y aminoglucósidos. Para obtener las farmacocinéticas "humanizadas" los antibióticos se administraron a cada ratón en dosis fraccionadas decrecientes. Los antibióticos se administraron por vía s.c., a intervalos de 15-20 minutos, determinando esta pauta de dosificación la farmacocinética en los ratones y se comparó con la misma dosis total en una única administración (cinética murina). Los animales de control solo recibieron diluyente.

Los resultados obtenidos en los diferentes grupos mostraron que las farmacocinéticas "humanizadas" fueron superiores en actividad que la administración en una dosis única de ticarcilina, ceftriaxona y ceftazidima, mientras que para los aminoglucósidos, netilmicina y gentamicina, se observaron pequeñas diferencias en los resultados entre las dos pautas de dosificación. Estas diferencias fueron confirmadas en estudios posteriores ¹⁹⁶, y los autores concluyeron que cuando se empleaban en infecciones experimentales por *P. aeruginosa*, las diferencias entre las dos clases de antibióticos probablemente reflejaban las

diferencias entre la tasa de letalidad, la intensidad de la actividad bactericida y el efecto post-antibiótico. La actividad de los aminoglucósidos era primordialmente dosis-dependiente, seguida por un efecto post-antibiótico, mientras que el betalactámico estudiado fue primordialmente dosis-dependiente sin efecto postantibiótico.

Fluckiger et al.,¹⁹⁷ en el modelo de infección del muslo por *Escherichia coli* o *P. aeruginosa* y comparando una formulación intramuscular frente a la administración intravenosa de imipenem, utilizó también el método de múltiples inyecciones. Los resultados de la evolución concordaron con datos previos relativos a antibióticos betalactámicos, e imipenem resultó más efectivo cuanto más tiempo se mantuvieron sus concentraciones por encima de la CIM.

También Hishikawa et al.,¹⁹⁸ emplearon el método de dosis fraccionadas de Gerber¹⁹⁶ para simular en ratones las concentraciones séricas en humanos de dos cefalosporinas, cefazolina y cefmenoxima, y compararon la eficacia de una sola dosis frente a múltiples dosis en un modelo de neumonía experimental por *Klebsiella pneumoniae*. Los autores encontraron que no era posible predecir la evolución del tratamiento con pautas de dosis múltiples a partir de los estudios de pautas de una dosis única. Con posterioridad, Hatano et al.,¹⁹⁹ diseñaron una fórmula matemática para calcular las pautas de múltiple dosificación que aseguraran que las concentraciones en suero de ratón no fueran dos veces superiores a las observadas en humanos en cada período de tiempo y que también las áreas bajo la curva calculadas (AUC) en ratones fueran similares a las observadas en los humanos.

4.3. Reducción de la tasa de eliminación

Una alternativa a los métodos descritos hasta ahora, consiste en la coadministración de fármacos que tienen influencia sobre la tasa de eliminación de los antibióticos. Craig^{200, 201} y Fantin²⁰² han desarrollado estudios en los que a los animales de laboratorio se les producía disfunción renal, mediante la administración de nitrato de uranilo. Otros agentes capaces de producir alteración en la farmacocinética incluyen, entre otros, probenecid²⁰³ y diclofenaco²⁰⁴. En estudios realizados con conejos, la vida media en la fase de eliminación de ceftriaxona aumentó significativamente tras la coadministración de diclofenaco, y aunque no igualó a la vida media en humanos,

el efecto se pudo detectar en la respuesta terapéutica. Por otro lado, el probenecid administrado a ratones previo a la dosis de antibiótico aumentó los valores de área bajo la curva de cefradina y de nafcilina, y esto se reflejaba en un aumento de la potencia terapéutica en un modelo de infección del muslo por *E. coli* y de la infección del tracto urinario por *S. aureus*^{203, 205}. Por lo tanto es posible influir en el índice de eliminación de fármacos, pero este método no proporciona en todos los casos farmacocinéticas fiables y similares a la de los humanos.

4.4. Uso de técnicas de infusión

La modificación de las velocidades de administración de los compuestos para mantener concentraciones de antibióticos y compensar así las diferencias en los mecanismos de eliminación de las especies es otra de las alternativas propuestas. Los animales pueden estar o bien anestesiados o bien conscientes durante la infusión. Si la infusión se hace con el animal estando consciente, se pueden utilizar sistemas de "swivel", que conectan los catéteres intravasculares con los sistemas de infusión que, permiten el movimiento con una mínima restricción durante el estudio.

Los flujos de infusión intravenosa deben encontrarse dentro de los límites fisiológicos para la especie animal que se emplea y también se debe tener presente la estabilidad del antibiótico en el diluyente de infusión. Otro factor importante es determinar si el proceso de infusión puede influenciar la evolución terapéutica.

4.5. Infusión continua y dosificación prolongada

La infusión continua de antibióticos es una vía de administración que se usa más frecuentemente para tratar infecciones graves, en particular en pacientes inmunocomprometidos y para tratar infecciones causadas por bacterias gram-negativas²⁰⁶. Esta vía está considerada por diversos autores como la vía de elección para antibióticos betalactámicos en este grupo de pacientes²⁰⁶⁻²⁰⁸, ya que estos antibióticos no presentan actividad bactericida dependiente de la concentración. Otros antibióticos, como vancomicina y aminoglucósidos, también se pueden infundir en este grupo de pacientes^{209, 210}. La necesidad de determinar, no solo la vía de dosificación más efectiva, sino también la más barata, en términos de cantidades de sustancia gastada, y las necesidades de personal hospitalario,

respaldan el uso de estudios en animales para el desarrollo de pautas clínicas de dosificación apropiadas.

Bakker-Woudenberg et al.,²¹¹ en un estudio de infección respiratoria por *Klebsiella pneumoniae* en ratas que requería una infusión de más de 65 h, en el cual existía riesgo de que el catéter de infusión perdiera la permeabilidad, utilizó un sistema de infusión continua intratisular en un modelo de "jaula tisular", que le permitió alcanzar el estado de equilibrio a las 3 h.

Por otro lado, Naziri et al.,²¹² emplearon un enfoque diferente para solventar la infusión continua en un modelo de infección de herida quirúrgica. Para administrar de forma continua cefazolina a una dosis de 180 mg/kg durante 3 días empleó microbombas osmóticas implantadas intraperitonealmente; además, los animales recibieron una dosis de carga de 60 mg/kg i.p., 30 minutos antes de la infección y de la implantación de las bombas. Los animales así tratados se compararon con otros que recibieron la dosis de carga de 60 mg/kg y un tratamiento de 180 mg/kg en tres dosis fraccionadas. Los tratados con bomba osmótica presentaron unas concentraciones en suero similares durante el primer y segundo día (20,3 +/- 1,4 y 17,2 +/- 5,1 mg/L, respectivamente) mientras que a los animales que se les administraba la dosis fraccionada a las 8 horas de la última administración ya no se detectaban niveles de cefazolina en suero. La supervivencia a los 10 días y la reducción de la carga bacteriana en sangre y tejidos fue superior en los animales que recibieron la infusión continua.

Thauvin et al.,²¹³ también estudiaron la infusión intravascular continua frente a la inyección i.m. intermitente de ampicilina, en un modelo de endocarditis enterocócica en ratas. La infusión intravenosa se realizó en la vena cava superior mediante un catéter insertado a través de la vena yugular y que estaba conectado a una bomba de infusión con un flujo continuo de 0,8 mL/h. La dosis total diaria perfundida con bomba fue de 450 mg/kg y de 4500 mg/kg. La misma cantidad de 450 mg/kg diarios se fraccionó en tres dosis que se administraron por vía i.m. cada 8 h. El tratamiento se prolongó durante 5 días o hasta la muerte de los animales. Las diferencias entre los grupos terapéuticos fueron significativas, con una mayor eficacia en el grupo que recibieron la administración i.v., siendo en estos grupos donde se detectó

esterilización de las vegetaciones. Sin embargo, no se apreció diferencia entre la infusión i.v. de dosis alta y baja.

4.6. Simulación en animales de laboratorio de las curvas de concentración-tiempo en humanos

4.6.1. Infusión de soluciones continuamente diluidas

Para simular los perfiles humanos de concentraciones séricas se requieren estudios farmacocinéticos de los fármacos a estudiar tanto en humanos como en animales. Se ha demostrado que el sistema de infusión intravenosa continuamente diluida se adapta a los análisis mono y policompartimentales de los fármacos. Se han diseñado modelos matemáticos sobre la base de farmacocinéticas humanas y de conejo o rata para determinar la concentración inicial de la solución a perfundir y los volúmenes residuales de los reservorios que contienen la solución a medida que se va diluyendo durante la infusión ^{191, 214, 215}.

Woodnut et al.,¹⁹¹ estudiaron en el modelo de meningitis por *Klebsiella pneumoniae* desarrollado en conejos, la eficacia de la temocilina administrada en un bolo de 2 g i.v., simulando el perfil de concentraciones en humanos comparándola con la de la misma dosis de 2 g i.v., siguiendo el perfil cinético de los conejos, los resultados de la evolución terapéutica mostraron la superioridad de la administración del antibiótico imitando la media más prolongada que se observa en los humanos.

Este sistema de infusión se ha utilizado también en este y otros modelos experimentales ^{214, 215}. El principal inconveniente técnico de este modelo es la necesidad de disponer de diferentes reservorios con diferentes capacidades para la infusión de las distintas soluciones.

4.6.2. Infusión de flujos variables

La introducción de bombas de infusión programables controladas por ordenador que varían el flujo de infusión, haciendo que esta sea más eficiente y que se requiera menos preparación previa de aparatos, constituyó un nuevo enfoque para la simulación de farmacocinéticas humanas en los animales. Woodnutt ha descrito diferentes experiencias ²¹⁶⁻²²², en las cuales se desarrollaban métodos alternativos

en la aplicación de dichas bombas para simular en ratas conscientes e inconscientes curvas farmacocinéticas observadas en suero humano de antibióticos administrados por vía oral o parenteral. En dichos experimentos se desarrollaron modelos matemáticos para calcular los diferentes flujos de infusión que se requerían²²³. Los objetivos de dichos experimentos fueron, por un lado comparar la eficacia de diferentes regímenes de dosificación de amoxicilina/ácido clavulánico y de amoxicilina con la intención de seleccionar el régimen más apropiado en relación con la sensibilidad y la duración de las concentraciones por encima de la CIM, y por otro la determinación de los puntos de corte de sensibilidad.

El uso de sistemas de infusión con bombas controladas por ordenador para simular las farmacocinéticas en humanos se ha aplicado también en estudios de eficacia terapéutica en el modelo de endocarditis en ratas²²⁴⁻²²⁷. Blatter²²⁴, utilizó el modelo para determinar si la coadministración o no de aminoglucósidos aumentaba la eficacia de ceftriaxona. Por otro lado, Fluckiger²²⁵ empleó este sistema para definir un régimen adecuado de profilaxis con amoxicilina, mientras que Entenza²²⁶,²²⁷ estudió el uso potencial de nuevas quinolonas en la endocarditis infecciosa y también el posible uso de amoxicilina + ácido clavulánico en el tratamiento de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

5. Técnicas y modelo matemático de farmacocinética humanizada

En los estudios que aquí se comunican se empleó un sistema de infusión intravenosa de flujos variables para reproducir la farmacocinética que se encuentra en humanos en los animales de experimentación.

El proceso que lleva a conseguir la estandarización de las farmacocinéticas humanizadas en los animales se divide en tres etapas consecutivas:

A.- ESTUDIO DE LA FARMACOCINETICA DE LOS DISTINTOS ANTIMICROBIANOS EN EL ANIMAL. Determinación de las concentraciones séricas tras la administración endovenosa, en bolo, de cada uno de los antimicrobianos en el conejo. A partir de las concentraciones séricas determinaremos el perfil farmacocinético, las constantes de eliminación y distribución, esta última en el modelo bicompartimental, y el Volumen de distribución. Estos valores son imprescindibles para aplicar el modelo matemático de humanización de la farmacocinética en animales.

B.- APLICACION DE UN MODELO MATEMATICO. Este modelo nos permitirá conocer las dosis que hemos de ir administrando en cada período de tiempo al animal para pasar de un perfil farmacocinético animal a uno humanizado.

C.- ESTUDIO DE LA FARMACOCINETICA HUMANIZADA EN LOS ANIMALES. Práctica del ensayo de farmacocinética humanizada de los distintos antimicrobianos en el animal. Esto se realiza mediante la determinación de las concentraciones séricas de antibiótico tras la administración endovenosa mediante una bomba de infusión controlada por ordenador, de las dosis halladas tras la aplicación del modelo matemático. Este sistema de infusión nos permite administrar volúmenes diferentes a diferentes intervalos de tiempo. Así p.e., una secuencia que se puede realizar sería: 2000 $\mu\text{l/h}$ durante 6', luego 1500 $\mu\text{l/h}$ durante 3' etc... y así sucesivamente. También nos permite repetir esta secuencia tantas veces como deseemos. Por tanto, si consideramos una secuencia como la administración de una dosis de un antimicrobiano en humanos, podemos administrar al animal un tratamiento que simule al máximo la administración del fármaco al hombre (p.e. ampicilina 2 g/4h EV).

5.1. Estudio de la farmacocinética de los distintos antimicrobianos en el animal.

Este estudio se realizaron en grupos de 5 conejos sanos, como mínimo, para cada uno de los antimicrobianos. Los antibióticos, dosis y tiempos de extracción de las muestras de sangre fueron:

<i>Antibiótico</i>	<i>Dosis</i>	<i>t extracción postadministración (minutos)</i>
Ampicilina	100 mg/kg	5, 15, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 180
Gentamicina	6 mg/kg	5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240
Teicoplanina	20 mg/kg	4, 8, 10, 15, 20, 30, 60, 120, 240, 480
Ceftriaxona	50 mg/kg	4, 8, 12, 16, 20, 25, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300,

La extracción se realizó a través de un catéter colocado en la arteria carótida.

La determinación de las constantes farmacocinéticas necesarias fueron diferente dependiendo de si los antibióticos siguen un modelo de cinética de primer orden monocompartimental abierto (ampicilina) o bicompartimental (gentamicina, ceftriaxona, teicoplanina).

En el modelo monocompartimental, una vez conocidas las concentraciones séricas en el animal, se realizó la gráfica de la concentración en suero-tiempo y, posteriormente, utilizando el método de los Mínimos Cuadrados se obtuvieron las constantes de eliminación del fármaco (k_{el}) y la concentración plasmática a tiempo 0 (C_0) mediante la relación lineal existente entre el logaritmo neperiano de la concentración sérica en el eje de ordenadas y el tiempo de extracción en el de abscisas.

$$y = A - b x \quad \text{siendo } C_0 = e^A \text{ y } k_{el} = b$$

En este caso, la relación lineal tiene la siguiente forma:

$$\ln C_p = \ln C_0 - k_{el} \cdot t$$

donde C_p = Concentración plasmática en el tiempo (t).

El Volumen de distribución (Ad) se obtiene a partir de:

$$Ad = D / C_0$$

donde D = Dosis administrada en mg/kg

En el modelo de cinética de primer orden bicompartimental abierto la eliminación de los fármacos depende, al igual que en el monocompartimental, de la distribución y de la eliminación, pero adquiriendo en este caso una especial relevancia el proceso de distribución, hecho que no sucede en el modelo monocompartimental. En el modelo de primer orden bicompartimental pueden diferenciarse dos fases:

Una primera fase o rápida, determinada por la constante de disposición α , en la que el fármaco desaparece del compartimento endovascular, en gran parte, por paso al compartimento periférico (tejidos) (aunque simultáneamente se esté produciendo un cierto grado de eliminación y un cierto grado de retorno de los tejidos a la sangre).

Una segunda fase o lenta, determinada por la constante de disposición β , en la que ya se ha alcanzado un equilibrio entre el compartimento central y periférico; en esta fase los niveles plasmáticos disminuyen principalmente por la eliminación desde el compartimento central.

El curso temporal de los niveles plasmáticos depende de la suma de los procesos exponenciales, el α y el β :

$$C_p = A_0 \cdot e^{-\alpha \cdot t} + B_0 \cdot e^{-\beta \cdot t}$$

donde A_0 = concentración plasmática para $t = 0$ en la fase de distribución

B_0 = concentración plasmática para $t = 0$ en la fase de eliminación

Tras la administración de una dosis del fármaco a, al menos, 5 animales, se realizaron extracciones de sangre a diferentes tiempos, y se determinaron las diferentes concentraciones séricas. Calculamos la media a partir de los valores de los 5 animales, y se hizo la representación gráfica de los puntos obtenidos (curva concentraciones plasmáticas-tiempo). A partir de este gráfico, se consideró a partir de qué momento se iniciaba la fase de eliminación. Las concentraciones obtenidas en los tiempos posteriores, nos permitieron obtener, mediante el método de los

mínimos cuadrados, los valores de B_0 i β . mediante la relación lineal existente entre el logaritmo neperiano de la concentración sérica en el eje de ordenadas y el tiempo de extracción en el de abscisas.

$$y = A - b x \quad \text{siendo } B_0 = e^A \text{ y } k_{el} = \beta$$

En este caso, la relación lineal tiene la siguiente forma:

$$\ln C_p = \ln B_0 - \beta \cdot t$$

donde C_p = Concentración plasmática en el tiempo (t).

Posteriormente mediante la suma de residuales, se ajustaron las concentraciones de la fase de distribución a los valores de B_0 y β obtenidos previamente y luego igualmente por el método de los mínimos cuadrados, se obtiene los valores de A_0 y α . A partir de estos resultados podemos calcular: V_c = volumen de distribución del compartimento central; k_{21} = constante de distribución del compartimento periférico al central; k_{13} = constante de eliminación; C_0 = concentración plasmática teórica a tiempo 0.

$$C_0 = A_0 + B_0$$

$$V_c = D / C_0 \quad (D = \text{dosis (mg/kg)})$$

$$V_dA = (\alpha / k_{21}) \cdot V_c \quad (\text{Volumen distribución Area})$$

$$k_{21} = (A \cdot \beta + B \cdot \alpha) / C_0$$

$$k_{13} = \alpha \cdot \beta / k_{21} = k_{el}$$

5.2. Aplicación de un modelo matemático.

5.2.1. Administración endovenosa en infusión corta según modelo de cinética de primer orden monocompartimental abierto (ej.: ampicilina)

La cinética de eliminación en los fármacos que tienen una cinética de primer orden monocompartimental abierto se rige por la siguiente relación matemática:

$$C_p = C_0 \cdot e^{-k_{el} \cdot t}$$

donde C_p = concentración plasmática del fármaco en $\mu\text{g/mL}$.

C_0 = concentración plasmática a tiempo 0.

k_{el} = constante de eliminación.

t = tiempo en horas.

Entendemos pues que la única diferencia entre la cinética humana y la del conejo estriba en el valor de la k_{el} , que es superior en el roedor ($k_{elh} < k_{elc}$), o, en otras palabras que el tiempo de vida media del fármaco en humanos ($k_{el} = 0,693/t_{1/2}$) es más elevado que el del roedor.

$k_{el\ h}$ = constante de eliminación en el hombre

$k_{el\ c}$ = constante de eliminación en el conejo

El sistema que utilizado para humanizar la cinética de eliminación en el conejo se basó en la necesidad de proporcionar a este animal cantidades de fármaco decrecientes que contrarrestaran esta velocidad de eliminación elevada:

1.- Determinamos unos intervalos de tiempo (T_x) durante los que administraremos la cantidad de fármaco necesaria para pasar de la concentración sérica en el animal a la deseada humana.

2.- En el límite final de estos intervalos (T_x), la concentración plasmática del fármaco será más elevada en la cinética humana que en la del conejo (puesto que $k_{elc} > k_{elh}$). Determinamos la concentración que hemos de conseguir (C_y) para

contrarrestar esta diferencia. La concentración deseada (C_y), se obtendrá restando la concentración que deseamos alcanzar (Ch_x = concentración humana) de la concentración existente en el animal (Cc_x), mediante la siguiente proporción, donde x = número del intervalo:

$$C_y = Ch_x - Cc_x$$

donde para $x = 1$ $Ch_1 = C_0 \cdot e^{-k_{el}h \cdot t_1}$ y $Cc_1 = C_0 \cdot e^{-k_{el}c \cdot t_1}$

para $x = 2$ $Ch_2 = C_0 \cdot e^{-k_{el}h \cdot t_2}$ y $Cc_2 = Ch_1 \cdot e^{-k_{el}c \cdot t_2}$

siendo t = duración del tiempo en horas desde $t=0$ hasta el final del intervalo T_x

T = duración del tiempo en horas del intervalo T_x

Así pues, la fórmula general sería, para $x = 1, 2, 3, \dots, 4$

$$Ch_x = C_0 \cdot e^{-k_{el}h \cdot tx}$$

$$Cc_x = Ch_{x-1} \cdot e^{-k_{el}c \cdot tx}$$

3.- La cantidad de fármaco que hemos de administrar mediante infusión endovenosa continua, durante el intervalo de tiempo T_x , para conseguir la concentración deseada (C_y) (en mg/h) viene determinada por la siguiente relación:

$$Q_x = (C_y \cdot V_{dc} \cdot k_{el}c \cdot P) / (1 - e^{-k_{el}c \cdot T_x})$$

donde Q_x = dosis de antibiótico a administrar durante T_x (mg/h).

V_{dc} = volumen de distribución del fármaco en el conejo (l/kg).

T_x = intervalo de tiempo (h).

P = peso del animal (kg).

Obviamente, la primera dosis a administrar estará destinada a obtener C_0 y vendrá determinada por:

$$Q_x = (C_0 \cdot V_{dc} \cdot k_{el}c \cdot P) / (1 - e^{-k_{el}c \cdot T_x})$$

4.- Puesto que realizamos una infusión continua, la velocidad de infusión a la que se debía programar la bomba de infusión (V_x , en mL/h) dependía de la concentración de la disolución de antibiótico que se administraba (S , en mg/mL):

$$\text{si} \quad V_x = Q_x / S$$

Así pues, el volumen al cual se programaba la bomba de infusión que administró la cantidad necesaria de antibiótico durante cada uno de los intervalos de tiempo, para conseguir la concentración deseada que contrarrestaba la eliminación superior del conejo respecto a la humana, con el objeto de imitar la cinética de eliminación humana en los fármacos con modelo de distribución monocompartimental fue el siguiente:

$$V_x = ((C_0 \cdot e^{-k_{el}h \cdot tx}) - (Ch_{x-1} \cdot e^{-k_{el}c \cdot Tx})) \cdot Vdc \cdot k_{el}c \cdot P / (1 - e^{-k_{el}c \cdot Tx}) \cdot S$$

5.2.2. Administración endovenosa en infusión continua según modelo de cinética de primer orden monocompartimental abierto (ej.: ampicilina)

a.- Fase de infusión inicial:

La cantidad de fármaco que se debe administrar mediante infusión endovenosa continua (Q_x ; mg/h) para conseguir la concentración deseada (C_y) viene determinada por la siguiente relación:

$$Q_x = (C_y \cdot Vdc \cdot k_{el}c \cdot P) / (1 - e^{-k_{el}c \cdot tx})$$

donde Q_x = dosis de antibiótico a administrar durante tx (mg/h).

Vdc = volumen de distribución del fármaco en el conejo (l/kg).

T_x = intervalo de tiempo (h).

P = peso del animal (kg).

C_y = Concentración deseada a conseguir ($\mu\text{g/mL}$)

La velocidad de infusión a la que se debía programar la bomba de infusión (V_x , en mL/h) dependía de la concentración de la disolución de antibiótico que se administraba (S , en mg/mL):

$$V_x = Q_x / S$$

b.- Fase de mantenimiento:

La cantidad de fármaco a administrar mediante infusión endovenosa continua (Q_x ; mg/h) para mantener la concentración deseada (C_y) viene determinada por la siguiente relación:

$$Q_x = C_y \cdot V_{dc} \cdot k_{el} \cdot P$$

donde Q_x = dosis de antibiótico a administrar durante tx (mg/h).

V_{dc} = volumen de distribución del fármaco en el conejo (l/kg).

T_x = intervalo de tiempo (h).

P = peso del animal (kg).

C_y = Concentración deseada a mantener ($\mu\text{g/mL}$)

Como anteriormente, la velocidad de infusión a la que se ha de programar la bomba de infusión (V_x , en mL/h) dependerá de la concentración de la disolución de antibiótico que administremos (S , en mg/mL):

$$V_x = Q_x / S$$

5.2.3. Administración endovenosa en infusión corta según modelo de cinética de primer orden bicompartimental abierto (ej.: gentamicina, ceftriaxona, teicoplanina).

La cinética de los fármacos que siguen un modelo de primer orden bicompartimental abierto se rige por la siguiente relación matemática:

$$C_p = A_0 \cdot e^{-\alpha \cdot t} + B_0 \cdot e^{-\beta \cdot t}$$

donde A_0 = concentración plasmática para $t = 0$ en la fase de distribución

B_0 = concentración plasmática para $t = 0$ en la fase de eliminación

El propósito de este modelo matemático consistía en hallar las cantidades de antibiótico que se deben administrar al animal para contrarrestar su eliminación más rápida respecto a los humanos. Este modelo queda resumido a continuación:

1.- Determinar la concentración sérica humana que queremos obtener una hora después del inicio de una infusión de 0,5 h de duración (Ch_{1h}). Una vez determinada esta concentración, obtener la concentración sérica humana al final de la infusión de 0,5 h ($Ch_{0,5h}$) mediante la siguiente fórmula:

$$Ch_{0,5h} = Ah_0 \cdot e^{-\alpha h \cdot 0,5} + Bh_0 \cdot e^{-\beta h \cdot 0,5}$$

donde: Ah_0 y Bh_0 se obtienen con el siguiente sistema de ecuaciones:

$$\left. \begin{aligned} Ch_{1h} &= Ah_0 \cdot e^{-\alpha h \cdot 1} + Bh_0 \cdot e^{-\beta h \cdot 1} \\ k_{21}h &= (Ah_0 \cdot \beta h + Bh_0 \cdot \alpha h) / (Ah_0 + Bh_0) \end{aligned} \right\}$$

siendo βh , αh , $k_{21}h$ constantes humanas conocidas.

2.- Dividir el perfil farmacocinético en los dos fases características del modelo bicompartimental: primera hasta el final de la fase de distribución y segunda la fase de eliminación.

3.- FASE DE DISTRIBUCION:

3.1. Determinar la duración de esta fase en el conejo ($t\alpha$).

3.2. Obtener la concentración sérica en el conejo al final de este período (Cc_α) mediante la siguiente fórmula:

$$Cc_\alpha = Ac_0 \cdot e^{-\alpha c \cdot t\alpha} + Bc_0 \cdot e^{-\beta c \cdot t\alpha}$$

donde: Ac_0 y Bc_0 se obtienen con el siguiente sistema de ecuaciones:

$$\left. \begin{aligned} Cr_0 &= Ac_0 + Bc_0 \\ k_{21}c &= (Ac_0 \cdot \beta r + Bc_0 \cdot \alpha r) / (Ac_0 + Bc_0) \end{aligned} \right\}$$

siendo β_c , α_c , k_{21c} las constantes farmacocinéticas en el conejo previamente obtenidas (apartado 4.1.) y C_{c0} igual a $Ch_{0,5h}$ también obtenido previamente.

3.3. Obtener la concentración necesaria al final del período de distribución (Cx_α) que contrarreste la distribución más rápida del fármaco en el animal que en el humano, mediante la diferencia de la concentración sérica humana (Ch_α) de la del conejo (Cc_α) al final de este período.

$$\text{así: } Cx_\alpha = Ch_\alpha - Cc_\alpha$$

$$\text{donde: } Ch_\alpha = Ah_0 \cdot e^{-\alpha h \cdot t_\alpha} + Bh_0 \cdot e^{-\beta h \cdot t_\alpha}$$

$$Cc_\alpha = Ac_0 \cdot e^{-\alpha c \cdot t_\alpha} + Bc_0 \cdot e^{-\beta c \cdot t_\alpha}$$

4.- FASE DE ELIMINACION:

4.1. Se determinaron intervalos de tiempo (T_x) durante los que se administró la cantidad de fármaco necesaria para pasar de la concentración sérica en el animal a la deseada, similar a la humana.

4.2. En el límite final de estos intervalos (T_x), la concentración plasmática del fármaco será más elevada en la cinética humana que en la del conejo (puesto que $k_{elc} > k_{elh}$). Determinamos la concentración que hemos de conseguir (Cx_β) para contrarrestar esta diferencia. La concentración deseada (Cx_β), se obtendrá restando la concentración que deseamos alcanzar ($Ch_{\beta x}$ = concentración humana) de la concentración existente en el animal ($Cc_{\beta x}$), mediante la siguiente proporción, donde x = número del intervalo:

$$Cx_\beta = Ch_{\beta x} - Cc_{\beta x}$$

$$\text{donde para } T_x = 1 \quad Ch_{\beta 1} = Ah_0 \cdot e^{-\alpha h \cdot t_1} + Bh_0 \cdot e^{-\beta h \cdot t_1}$$

$$\text{y } Cc_{\beta 1} = Ch_\alpha \cdot e^{-k_{elc} \cdot T_1}$$

$$\text{para } T_x = 2 \quad Ch_{\beta 2} = Ah_0 \cdot e^{-\alpha h \cdot t_2} + Bh_0 \cdot e^{-\beta h \cdot t_2}$$

$$\text{y } Cc_{\beta 2} = Ch_{\beta 1} \cdot e^{-k_{elc} \cdot T_2}$$

siendo t_x = duración del tiempo en horas desde $t=0$ hasta el final del intervalo T_x

T_x = duración del tiempo en horas del intervalo T_x

Ch_α = Concentración sérica humana al final del período de distribución

5.- La cantidad de fármaco que se debía administrar mediante infusión endovenosa continua (Q_x - en mg/h), durante la fase de distribución (t_α) y durante los intervalos de tiempo T_x de la fase de eliminación, para conseguir la concentración deseada en la fase de distribución y de eliminación ($C_{x\alpha}$ y $C_{x\beta}$) viene determinada por la siguiente relación:

Fase distribución: $Q_{\alpha x} = (C_{x\alpha} \cdot V_{dc} \cdot k_{elc} \cdot P) / (1 + ((\beta c - k_{elc}/\alpha c - \beta c) \cdot e^{-\alpha c \cdot t_\alpha}) + ((k_{elc} - \alpha c/\alpha c - \beta c) \cdot e^{-\beta c \cdot t_\alpha})$

Fase eliminación: $Q_{\beta x} = (C_{x\beta} \cdot V_{dc} \cdot k_{elc} \cdot P) / (1 + ((\beta c - k_{elc}/\alpha c - \beta c) \cdot e^{-\alpha c \cdot T_x}) + ((k_{elc} - \alpha c/\alpha c - \beta c) \cdot e^{-\beta c \cdot T_x})$

6.- Puesto que se realizaba una infusión continua, la velocidad de infusión a la que se programaba la bomba de infusión (V_x , en mL/h) dependía de la concentración de la disolución de antibiótico que administremos (S , en mg/mL):

$$V_x = Q_x / S$$

7.- La primera dosis viene determinada por esta última fórmula siendo C_x la concentración humana al fin de la infusión de 0,5 h ($Ch_{0,5h}$).

5.2.4. Administración endovenosa en infusión continua según modelo de cinética de primer orden bicompartimental abierto (ceftriaxona)

a.- Fase de infusión inicial:

La cantidad de fármaco a administrar mediante infusión endovenosa continua (Q_x ; mg/h) para conseguir la concentración deseada (C_y) viene determinada por la siguiente relación:

$$Q_x = (C_y \cdot V_{dc} \cdot k_{elc} \cdot P) / (1 + ((\beta c - k_{elc}/\alpha c - \beta c) \cdot e^{-\alpha c \cdot t_x}) + ((k_{elc} - \alpha c/\alpha c - \beta c) \cdot e^{-\beta c \cdot t_x})$$

donde

Q_x = dosis de antibiótico a administrar durante t_x (mg/h).

V_{dc} = volumen de distribución del fármaco en el compartimento central en el conejo (l/kg).

t_x = intervalo de tiempo (h).

P = peso del animal (kg).

C_y = Concentración deseada a conseguir ($\mu\text{g/mL}$)

α_c = constante de disposición α en el conejo (h^{-1})

β_c = constante de disposición β en el conejo (h^{-1})

k_{elc} = constante de eliminación en el conejo; k_{13} (h^{-1})

La velocidad de infusión a la que hemos de programar la bomba de infusión (V_x , en mL/h) dependerá de la concentración de la disolución de antibiótico que administremos (S , en mg/mL):

$$V_x = Q_x / S$$

b.- Fase de mantenimiento:

La cantidad de fármaco a administrar mediante infusión endovenosa continua (Q_x ; mg/h) para mantener la concentración deseada (C_y) viene determinada por la siguiente relación:

$$Q_x = C_y \cdot V_{dAc} \cdot \beta_c \cdot P$$

V_{dAc} = Volumen de distribución Area en el conejo (L/kg)

Como anteriormente, la velocidad de infusión a la que se debía programar la bomba de infusión (V_x , en mL/h) dependía de la concentración de la disolución de antibiótico que se administraba (S , en mg/mL):

$$V_x = Q_x / S$$

5.3. Estudio de la farmacocinética humanizada en los animales

La perfusión de antimicrobianos se realizó mediante bombas de infusión endovenosa KD Scientific® de dispensación múltiple controlada por ordenador, que

permitían administrar por vía endovenosa dosis decrecientes de antibiótico a intervalos de tiempo predeterminados.

Para la perfusión de antibióticos se colocó a cada uno de los animales un catéter en la vena cava superior. El animal se anestesia con 1,5 mL/kg de una mezcla de ketamina^R (1 mg/kg) y Xylazene^R (0,1 mg/kg) i.m. Se practica una incisión en la zona lateral derecha del cuello y la vena yugular común derecha se pone a plano y se liga distalmente. Por una pequeña incisión, se colocan los catéteres estériles en la vena, y se avanzan en dirección distal hasta llegar a la vena cava (3-4 cm). El catéter utilizado es de polietileno con un diámetro externo de 1,27 mm e interno de 0,96 mm. Posteriormente el catéter se tuneliza, vía subcutánea hasta el espacio interescapular. En este punto se externaliza y se fija a un sistema de sujeción para catéteres en conejos Alice King®, saliendo el catéter por la parte superior de la jaula y conectándose a la jeringa de la bomba de infusión. Asimismo, se coloca un catéter en la arteria carótida derecha por donde se tomarán las muestras de sangre para poder determinar las concentraciones séricas.

Estos estudios se realizaron en grupos de 5 conejos sanos, como mínimo, para cada uno de los antimicrobianos. Los antibióticos, dosis humanizadas (dosis humana a simular), concentración máxima a obtener (C_{max}) y tiempos de extracción de las muestras fueron como ejemplo orientador:

Antibiótico Dosis humanizada - C_{max} t extracción postadministración (minutos)

Ampicilina 2 g EV 80 µg/mL 5,15,30,60,90,120,180,240

Gentamicina 1 mg/kg EV 3 µg/mL 5,15,30,60,90,120,180,240,360,480

Teicoplanina 10 mg/kg EV 150 µg/mL 5,15,30,60,120,240,360,480,600,720, 1440

Ceftriaxona 2 g EV 250 µg/mL 5,30,60,120,180,240,360,720,1080,1440

A continuación se detallan las técnicas de determinación de las concentraciones séricas de los antibióticos que se utilizarán en los apartados 4.a y 4.c de los estudios farmacocinéticos.

a.- Determinación de la concentración sérica de ampicilina y ceftriaxona mediante bioensayo microbiológico.

La concentración sérica de ampicilina, cloxacilina y ceftriaxona en conejos, a diferentes periodos de tiempo, se mide por la técnica de bioensayo microbiológico mediante la técnica de disco-placa ²²⁸. Para el bioensayo el microorganismo indicador utilizado es *Micrococcus lutea* ATCC 9341. El agar en que crece el microorganismo indicador es agar antibiótico número 5. El suero problema y la solución que contiene una concentración conocida del antibiótico a analizar (concentraciones estándar) se ponen en discos estériles que se depositan encima de la superficie del agar con el microorganismo indicador. El antibiótico difunde a través del agar e inhibe el crecimiento del microorganismo indicador. Después de 24 h de incubación se miden las zonas de inhibición. A partir de los resultados de las concentraciones estándar, se construye una recta de regresión poniendo en el eje **x** las zonas de inhibición y en el eje **y** el logaritmo ₁₀ las concentraciones estándar. Con esta recta de regresión podremos conocer las concentraciones de antibiótico de los sueros problema a partir de los diámetros de sus zonas de inhibición.

b.- Determinación de la concentración sérica de gentamicina y teicoplanina.

La determinación de las concentraciones séricas de gentamicina y teicoplanina se efectúa mediante la técnica de inmunoensayo homogéneo de fluorescencia polarizada, en analizador automático TDx (Abbot).

6. Endocarditis enterocócica

Los enterococos causan entre el 10% a 15% de los casos de endocarditis en un hospital general. De las especies más frecuentemente aisladas en infecciones humanas *Enterococcus faecalis* es la mayor causa de endocarditis ²²⁹.

La endocarditis enterocócica es principalmente una infección de personas ancianas con trastornos genitourinarios. A veces se asocia con instrumentación urológica, parto y aborto. La infección a menudo se adquiere durante la hospitalización ²²⁹. Además, en los últimos 15 años a la resistencia innata de los enterococos se ha añadido la resistencia adquirida a los aminoglucósidos y la vancomicina ²³⁰.

6.1. Características microbiológicas

Los enterococos son cocos grampositivos que forman parte de la flora normal del tracto gastrointestinal y, en ocasiones, de la uretra distal. Todos los enterococos tipan con el grupo D de Lancefield; son catalasa negativa e inmóviles; y en agar sangre pueden ser alfa-, beta-, o gamma-hemolíticos. Crecen bien en presencia de azida sódica ("caldo SF"), un 40% de bilis, un 6,5% de NaCl, y un 0,1% de azul de metileno y pueden sobrevivir a un calentamiento a 56°C durante 30 minutos o a pH de 9,6 y deben diferenciarse de *Streptococcus bovis* ²³¹.

6.2. Epidemiología

Las especies pertenecientes al género *Enterococcus* son la tercera causa más común de endocarditis, tras los estreptococos del grupo viridans y *S. aureus*. La EI debida a enterococos se asocia a morbilidad y mortalidad considerables ²²⁹. El género *Enterococcus* es responsable del 5 al 18% de los casos de EI, y la incidencia parece ir en aumento ^{229, 232, 233}. La enfermedad generalmente sigue un curso subagudo y afecta a hombres mayores (59 años de media) tras manipulación genitourinaria o mujeres algo más jóvenes (37 años de media) tras procedimientos obstétricos, la relación hombre mujer suele ser 2:1. El origen genitourinario se encontró entre un 14-70% de los casos ^{2, 14, 20, 231, 234,-239}. La bacteriuria por enterococos es una pista diagnóstica útil y en un estudio se encontró en 4 de 15 enfermos ²³¹. El origen gastrointestinal se encontró entre un 3 y un 27% de los

casos, y generalmente incluyó trastornos, procedimientos o cirugía que afectaba al tracto biliar o el intestino grueso²²⁹. Las válvulas del corazón izquierdo son las que resultan afectadas con más frecuencia, incluso en los pacientes con abuso de drogas por vía parenteral. Cuando la fiebre reumática tenía una elevada prevalencia, la válvula mitral resultaba la más afectada, pero en la actualidad, la incidencia de afectación de la válvula mitral y aórtica es más similar^{229, 235, 238}.

6.3. Características clínicas

La insuficiencia cardiaca congestiva aparece en un 13-44% de los casos de endocarditis enterocócica sobre válvula nativa. Los accidentes embólicos mayores ocurren entre un 2-70% de los casos, aunque otras series indican menor frecuencia de embolización (2-8%)^{237, 238}. La mortalidad de la endocarditis enterocócica en la era antibiótica variaba entre distintas series en función de si los pacientes recibían un tratamiento estándar combinado, (entre un 0 y 40%) o si recibieron un tratamiento inapropiado (entre un 17-100%)²²⁹. La curación es difícil debido a la resistencia intrínseca a muchos antibióticos, y la enfermedad sigue teniendo una mortalidad elevada. Con el aumento del uso de cefalosporinas de tercera generación, las cuales son relativamente inactivas in vitro frente a los enterococos, y otros factores contribuyentes (ex.: sondas urinarias permanentes), algunas series^{229, 240, 241} han mostrado un incremento alarmante en la bacteriemia enterocócica durante las 2 últimas décadas. La mayoría de las bacteriemias enterocócicas son de origen nosocomial, y a menudo polimicrobianas (42% en una serie)²³⁷ y están asociadas con alteraciones de base serias. Los factores que sugieren EI en pacientes con bacteriemia enterocócica incluyen (1) adquisición en la comunidad, (2) enfermedad cardiaca valvular preexistente, (3) una fuente indocumentada, y (4) la ausencia de bacteriemia polimicrobiana²³⁷. Las políticas de utilización de antibióticos, el envejecimiento de la población y la práctica de procedimientos invasivos en adultos hospitalizados tienden en conjunto a un aumento en el futuro de infecciones enterocócicas graves, incluyendo la EI.

6.4. Problemática del tratamiento de la endocarditis enterocócica

El tratamiento de la endocarditis plantea problemas, tanto para el clínico como para el paciente. El clínico, basándose principalmente en datos empíricos debe decidir que tratamiento administra, y el paciente ha de asumir que el tratamiento que recibe se prolonga un período de tiempo superior al que esperaba y que durante el tratamiento prolongado pueden aparecer efectos indeseables con frecuencia. Por todo ello serían deseables tratamientos más cortos sin que ello resulte en pérdida de eficacia²⁴². En el caso de la EI no complicada, causada por estreptococos viridans se ha comprobado que tratamientos de dos semanas de duración pueden curar la enfermedad. En el caso de los enterococos, la mayoría de recomendaciones todavía aconsejan la combinación de un betalactámico con un aminoglucósido durante al menos 4-6 semanas. Un claro inconveniente de este tratamiento es la toxicidad de los aminoglucósidos, la cual adquiere mayor importancia cuando se aplica a pacientes de edad avanzada con endocarditis enterocócica²⁴². La endocarditis enterocócica siempre se ha contemplado como una infección difícil de curar, incluso antes de que se detectara la aparición de resistencias a aminoglucósidos, betalactámicos y glicopéptidos. Los fracasos terapéuticos ya presentaban tasas inaceptables cuando el tratamiento se realizaba con penicilina sola. Los enterococos presentan una mayor resistencia constitucional a los antibióticos betalactámicos y típicamente son más tolerantes a la acción bactericida de este y otros grupos de antibióticos que actúan al nivel de la síntesis de la pared celular. Los enterococos parecen presentar variabilidad entre cepas, algunas de ellas experimentan lisis celular y mueren al estar expuestas a las penicilinas, mientras que otras son muy tolerantes²⁴³⁻²⁴⁵. La ampicilina combinada con un aminoglucósido está considerada como el tratamiento de primera elección para la EI causada por *E. faecalis*. La duración de este tratamiento se establece entre 4 y 6 semanas^{238, 246, 247}.

Uno de los inconvenientes de la terapia antibiótica de la endocarditis enterocócica es el largo período de tratamiento con aminoglucósidos, en especial en los pacientes de edad avanzada. Con el fin de reducir los efectos adversos de nefrotoxicidad y ototoxicidad, se recomienda adecuar el tratamiento a los niveles séricos. A pesar de

una dosificación y control cuidadosos, a menudo se altera la función renal y se requiere la retirada de los aminoglucósidos ²⁴².

El mejor conocimiento de las características farmacocinéticas y farmacodinámicas de los aminoglucósidos llevaron a plantearse en las últimas décadas las pautas de administración de estos antibióticos.

Los aminoglucósidos muestran un patrón de actividad bactericida que es dependiente de la concentración del antimicrobiano, pero no del tiempo de exposición de las bacterias. Esto lleva a concluir que el objetivo del tratamiento con aminoglucósidos debe ser incrementar al máximo la C_{max}, administrando la dosis más alta posible que permita el límite de toxicidad ^{248, 249}.

Estudios clínicos han mostrado que existe relación directa entre la C_{max} del aminoglucósido y la respuesta terapéutica en el tratamiento de la bacteriemia y la neumonía por bacilos gramnegativos ²⁴⁹. También se ha constatado que un cociente C_{max}/CIM > 10 consigue el máximo efecto bactericida y disminuye la selección de poblaciones resistentes ²⁵⁰.

El mejor conocimiento de la farmacodinámica y los mecanismos que provocan toxicidad puso en marcha estudios clínicos que comparaban la administración única diaria con la administración fraccionada de los aminoglucósidos. En general, los datos que se obtenían sugerían que la pauta de monodosis era igual de eficaz y tendía a ser menos nefrotóxica que la administración fraccionada ²⁴⁸. Estos resultados tienen como punto débil que la metodología empleada no era la adecuada para comparar cual de las dos pautas era más adecuada para el tratamiento de las infecciones. También existen datos que sugieren que la administración en monodosis es útil en la reducción de la nefrotoxicidad ²⁴⁸. Esto ha llevado a que en la práctica clínica la aceptación de la pauta de monodosis es un fenómeno casi generalizado, pero aún quedan por resolver cuestiones como que papel puede desempeñar la monodosis en situaciones especiales, como son el aumento del volumen de distribución, la reducción del aclaramiento renal de aminoglucósidos y en el caso de la endocarditis infecciosa ²⁴⁸.

Los estudios experimentales que comparan la administración de aminoglucósidos en una sola dosis o la dosis fraccionada incluyen modelos animales de neumonía,

abscesos subcutáneos, peritonitis y endocarditis^{224, 249-260}. Estos estudios utilizaban el tratamiento de aminoglucósidos solos o combinados con antibióticos betalactámicos. Los estudios relacionados con modelos experimentales de endocarditis han mostrado resultados controvertidos, en función de la cepa bacteriana, así como el aminoglucósido y el betalactámico usado^{224, 255, 257-260}.

La aparición y el incremento en la prevalencia de resistencia a betalactámicos, glucopéptidos y aminoglucósidos ha contribuido a complicar las opciones terapéuticas en la endocarditis enterocócica. El desarrollo de resistencia de alto nivel a estreptomina (CIM > 2000 mg/L) entre las décadas de 1960 y 1970 limitó el uso de rutina de la combinación de penicilina con estreptomina, no obstante dichas cepas continuaban siendo sensibles a la combinación bactericida de penicilina con gentamicina, la cual se mostraba efectiva en el tratamiento de la endocarditis. La aparición de resistencia de alto nivel a gentamicina al final de la década de 1970 y la década de 1980 generó una situación en la cual no existía un tratamiento bactericida. El aumento de la prevalencia de la resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos constituye una característica creciente²⁶¹.

7. Perspectivas del tratamiento ambulatorio.

Tradicionalmente, los pacientes con infecciones graves se han tratado en el ámbito hospitalario. Los avances en la terapia antibiótica, los sistemas de acceso intravenoso y la creciente aceptación en la seguridad y la eficacia de los tratamientos han facilitado que cada vez exista un número creciente de enfermos que reciban la terapia antibiótica de forma ambulatoria ²⁶².

Del mismo modo, históricamente, los pacientes con El permanecían ingresados en el hospital durante la mayor parte del curso de su enfermedad, recibían tratamiento por vía parenteral, hacían reposo en cama y eran examinados a diario para detectar signos de persistencia de la infección cardíaca, insuficiencia cardíaca o trastornos del ritmo, aparición de metástasis antibiótica y efectos adversos de la terapia. Recientemente, este modelo de atención hospitalaria está cambiando gracias a la adopción de tratamientos eficaces más cortos, la capacidad de poder administrar tratamientos parenterales ambulatorios y presiones económicas que propician ingresos hospitalarios más cortos ²⁶³. En la actualidad, una fracción de pacientes con El son asistidos de forma ambulatoria por algún período del tratamiento, aunque hay una carencia de estudios que incluyan un número grande de este tipo de pacientes.

En el tratamiento de la endocarditis enterocócica, la administración de antibióticos en una sola dosis diaria permitiría, que en casos seleccionados de pacientes que no presenten complicaciones y tras un período inicial de tratamiento intrahospitalario, se pudiera completar la terapia de forma ambulatoria, con lo cual se reduce la estancia y coste de ingreso en un centro asistencial.

2. PUBLICACIONES

1. Objetivos generales

1 El primer objetivo de este trabajo es la aplicación del modelo de endocarditis infecciosa en el conejo para evaluar la administración del tratamiento antimicrobiano mediante la infusión intravenosa, utilizando bombas de perfusión programables, que permitan reproducir en el suero del animal de experimentación, el conejo, los perfiles séricos farmacocinéticos que se obtienen en humanos. A partir de este punto es posible plantearse pautas que puedan aportar algún tipo de beneficio en el tratamiento de esta enfermedad, bien sea porque mejoran las posibilidades bactericidas, bien porque reduzcan la toxicidad o bien porque reduzcan el tiempo de tratamiento.

2 Un segundo objetivo es evaluar en el modelo experimental de endocarditis infecciosa en conejos la eficacia terapéutica de combinaciones de antibióticos que permitan la administración en una sola dosis diaria de antimicrobianos, resultando en pautas de tratamiento de una mayor sencillez.

3 El tercer objetivo es la evaluación en el modelo experimental de endocarditis enterocócica en conejos la eficacia de la combinación de ampicilina más ceftriaxona, administradas de forma que se simulen los perfiles farmacocinéticos observados en el suero de los humanos, en el tratamiento de la endocarditis causada por cepas de *Enterococcus faecalis* que presentan o no resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos.

2. Estudio 1

Efficacy of Ampicillin plus Ceftriaxone in Treatment of Experimental Endocarditis Due to *Enterococcus faecalis* Strains Highly Resistant to Aminoglycosides.

Joan Gavaldà, Carmen Torres, Carmen Tenorio, Pedro López, Myriam Zaragoza, Josep A. Capdevila, Benito Almirante, Fernanda Ruiz, Nuria Borrell, Xavier Gomis, Carles Pigrau, Fernando Baquero y Albert Pahissa.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1999. Vol: 43. p. 639–646.

2.1 Objetivos concretos del Estudio 1.

1. Desarrollar un modelo matemático basado en un patrón farmacocinético bicompartimental que permita determinar cuáles son las dosis a administrar al animal de experimentación mediante un sistema de bombas de infusión, controladas por ordenador, para simular los perfiles farmacocinéticos de ceftriaxona en humanos. Para ello, se evaluaron los parámetros farmacocinéticos en conejos sanos, y tras esto se administró la ceftriaxona a los animales de una forma en la que se reprodujera en el suero del animal el perfil sérico que se consigue en humanos tras una administración de 2 g., de ceftriaxona.
2. Evaluar si el efecto de la combinación de ampicilina y ceftriaxona observado *in vitro* por Mainardi et al.,²⁶⁴ se mantenía cuando se estudiaba un número mayor de cepas de *E. faecalis* con elevado nivel de resistencia a los aminoglucósidos, y se utilizaban otro tipo de técnicas, como las curvas de letalidad.
3. Evaluar la eficacia terapéutica de la combinación de ampicilina y ceftriaxona, administrada a los animales simulando los perfiles farmacocinéticos que presentan los humanos, para el tratamiento de la endocarditis experimental causada por cepas de *E. faecalis* con alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos.

Efficacy of Ampicillin plus Ceftriaxone in Treatment of Experimental Endocarditis Due to *Enterococcus faecalis* Strains Highly Resistant to Aminoglycosides

JOAN GAVALDÀ,^{1*} CARMEN TORRES,² CARMEN TENORIO,² PEDRO LÓPEZ,¹
 MYRIAM ZARAGOZA,² JOSEP A. CAPDEVILA,¹ BENITO ALMIRANTE,³
 FERNANDA RUIZ,² NURIA BORRELL,¹ XAVIER GOMIS,¹
 CARLES PIGRAU,¹ FERNANDO BAQUERO,³
 AND ALBERT PAHISSA¹

Infectious Diseases Research Laboratory, Infectious Diseases Division, Hospital General Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona,¹ Universidad de la Rioja, Logroño,² and Microbiology Service, Hospital Ramón y Cajal, Madrid,³ Spain

Received 17 February 1998/Returned for modification 27 April 1998/Accepted 30 December 1998

The purpose of this work was to evaluate the *in vitro* possibilities of ampicillin-ceftriaxone combinations for 10 *Enterococcus faecalis* strains with high-level resistance to aminoglycosides (HLRag) and to assess the efficacy of ampicillin plus ceftriaxone, both administered with humanlike pharmacokinetics, for the treatment of experimental endocarditis due to HLRag *E. faecalis*. A reduction of 1 to 4 dilutions in MICs of ampicillin was obtained when ampicillin was combined with a fixed subinhibitory ceftriaxone concentration of 4 µg/ml. This potentiating effect was also observed by the double disk method with all 10 strains. Time-kill studies performed with 1 and 2 µg of ampicillin alone per ml or in combination with 5, 10, 20, 40, and 60 µg of ceftriaxone per ml showed a $\geq 2 \log_{10}$ reduction in CFU per milliliter with respect to ampicillin alone and to the initial inoculum for all 10 *E. faecalis* strains studied. This effect was obtained for seven strains with the combination of 2 µg of ampicillin per ml plus 10 µg of ceftriaxone per ml and for six strains with 5 µg of ceftriaxone per ml. Animals with catheter-induced endocarditis were infected intravenously with 10^8 CFU of *E. faecalis* V48 or 10^7 CFU of *E. faecalis* V45 and were treated for 3 days with humanlike pharmacokinetics of 2 g of ampicillin every 4 h, alone or combined with 2 g of ceftriaxone every 12 h. The levels in serum and the pharmacokinetic parameters of the humanlike pharmacokinetics of ampicillin or ceftriaxone in rabbits were similar to those found in humans treated with 2 g of ampicillin or ceftriaxone intravenously. Results of the therapy for experimental endocarditis caused by *E. faecalis* V48 or V45 showed that the residual bacterial titers in aortic valve vegetations were significantly lower in the animals treated with the combinations of ampicillin plus ceftriaxone than in those treated with ampicillin alone ($P < 0.001$). The combination of ampicillin and ceftriaxone showed *in vitro* and *in vivo* synergism against HLRag *E. faecalis*.

The American Heart Association recommends 4 to 6 weeks of penicillin or ampicillin plus an aminoglycoside for treatment of enterococcal endocarditis (45). After the first reports, in the late 1970s, of clinical isolations of *Enterococcus faecalis* with high-level resistance to aminoglycosides (HLRag) (23), the number of infections caused by HLRag strains has been increasing. At the present time, *E. faecalis* with HLRag occurs worldwide (5, 11, 35, 43). High-level resistance to streptomycin and gentamicin precludes bactericidal synergism with penicillins or glycopeptides (8, 11, 12). This fact causes a problem for the treatment of patients with endocarditis caused by these strains. Results from animal studies using the endocarditis model have provided controversial data about the efficacy of ampicillin administered by continuous intravenous (i.v.) infusion, and they are clearly not definitive (21, 40). A small number of patients have been cured with antibiotic treatment alone, and others have required valve replacement (1, 9, 14, 25, 26, 28, 29, 34, 36-38). To date, no proven therapy is known to be as effective as ampicillin or penicillin plus an aminoglycoside for infections caused by these strains when bactericidal

activity is desirable, as in infective endocarditis; thus, new alternatives for treatment should be evaluated. Recently, Mainardi et al. (30) demonstrated a synergistic effect of amoxicillin and cefotaxime against 48 of 50 clinical strains of *E. faecalis*. This experience of amoxicillin-cefotaxime synergy against *E. faecalis* was limited to only two HLRag strains.

The studies of antimicrobial efficacy in experimental models of infection provide an important basis for clinical investigative studies in humans, but antibiotic pharmacokinetics may differ greatly between humans and animals because of the higher elimination rate of the drugs in animals. In order to surmount this problem, different authors have used animal models of humanlike pharmacokinetics (6, 19, 31). In previous experiments, we described a mathematical model that determines the doses to be given to animals by a computer-controlled infusion pump system to obtain serum profiles for rabbits similar to those observed in humans after i.v. administration of a drug in an open one-compartment pharmacokinetic model (19). The first purpose of this study was to develop a new and amenable open two-compartment pharmacokinetics mathematical model that would enable us to determine the doses to be administered to rabbits by a computer-controlled infusion pump system to simulate the human kinetics of an antimicrobial. Thus, the elimination kinetics of ceftriaxone was examined in healthy rabbits, and thereafter, ceftriaxone was administered to the

* Corresponding author. Mailing address: Servei de Malalties Infeccioses, Hospital General Vall d'Hebron, Hospitals Vall d'Hebron, Avda. Vall d'Hebron, 119-129, 08035 Barcelona, Spain. Phone: 34.93.4894033. Fax: 34.93.2746057. E-mail: gavalda@hg.vhebron.es.

animals in a way that simulated the human serum profile following an i.v. bolus dose of 2 g.

The second purpose of this study was to confirm and enlarge the previous observations from the work of Mainardi et al. (30), by evaluating the in vitro effect of the combination of ampicillin plus ceftriaxone in a large number of HLRAg *E. faecalis* strains and applying complementary techniques, such as time-kill curves. In addition, we investigated the therapeutic outcome of the combination of ampicillin plus ceftriaxone, both given with humanlike pharmacokinetics, in the treatment of experimental endocarditis due to *E. faecalis* strains highly resistant to aminoglycosides.

(This work was presented in part at the 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, October 1996, New Orleans, La. [20].)

MATERIALS AND METHODS

In vitro studies. (i) **Bacterial strains.** We studied 10 *E. faecalis* strains, originally isolated from patients with a clinically documented infection, which were susceptible to ampicillin or vancomycin and highly resistant to aminoglycosides. The strains were first identified by the API 20 STREP system (BioMérieux, La Balme-Les-Grottes, France) and later confirmed according to the criteria recommended by Facklam and Collins (13). The in vivo studies were performed with two HLRAg *E. faecalis* strains (V45 and V48) originally isolated from the blood of two patients with endocarditis. Working stock cultures were kept frozen at -70°C in double-strength skim milk (Difco Laboratories, Detroit, Mich.). Before each experiment, one aliquot was thawed and subcultured onto 5% sheep blood Columbia agar plates (BioMérieux).

(ii) **Media and antibiotics.** Mueller-Hinton broth (MHB), Mueller-Hinton agar (MHA) plates, and brain heart infusion (BHI) agar plates (Difco Laboratories) were used. The antibiotics included were ampicillin (Antibioticos SA, Madrid, Spain); ceftriaxone (Roche SA, Madrid, Spain); and streptomycin, tobramycin, gentamicin, kanamycin, and amikacin (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). Ampicillin and ceftriaxone solutions were prepared fresh on the day used. Stock solutions of streptomycin, tobramycin, gentamicin, kanamycin, and amikacin were prepared and stored at -20°C .

(iii) **In vitro antibiotic susceptibility tests.** MICs were determined on MHA by the standard agar dilution method (32). Plates were inoculated with a Steers replicator (10^7 CFU/spot) and incubated at 37°C for 18 h. MICs of ampicillin were determined on MHA alone and in combination with a fixed concentration of ceftriaxone (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Strains with aminoglycoside (streptomycin, gentamicin, tobramycin, and kanamycin) MICs of $\geq 2,000$ $\mu\text{g}/\text{ml}$ were considered to be in the HLRAg category. To determine the bactericidal effect of ampicillin, the microdilution method was followed by using cation-adjusted MHB and an initial inoculum of approximately 5×10^7 CFU/ml. Ampicillin concentrations ranging from 0.06 to 128 $\mu\text{g}/\text{ml}$ were assayed, and after 24 h of incubation at 37°C , an aliquot of 50 μl was spotted onto BHI agar plates supplemented with 1,000 IU of penicillinase (Difco Laboratories). Plates were incubated at 37°C for 48 h, and colonies were counted. An effect was considered bactericidal when a $\approx 99.9\%$ reduction in colony counts was obtained with respect to the initial inoculum (27).

(iv) **Synergy studies.** A qualitative estimation of the synergy between ampicillin and ceftriaxone (bacteriostatic interaction) was obtained by the double disk method (ampicillin, 30 μg ; ceftriaxone, 30 μg) on BHI agar plates. To perform time-kill synergy studies, the method described by Sahar and Torres was followed (39). Prior to inoculation, each tube of fresh BHI broth was supplemented with ampicillin (final concentrations of 1 and 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) either alone or in combination with ceftriaxone (final concentrations, 5, 10, 20, 40, and 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$). A positive growth tube without antibiotics was used as a control. Test tubes were inoculated (final concentration, 10^7 CFU/ml) and incubated at 37°C , and the number of CFU per milliliter was determined after 0, 4, and 24 h of incubation. The carryover effect was excluded by using BHI agar plates supplemented with penicillinase. Antimicrobial cooperation was defined as a $\geq 2 \log_{10}$ decrease in CFU per milliliter between the combination and its most active agent alone after 24 h, with the number of surviving organisms in the presence of the combination $\approx 2 \log_{10}$ CFU/ml below the starting inoculum. According to the American Society for Microbiology definition of synergy, one of the drugs must be present in a concentration which does not affect the growth curve of the test organism when used alone. The combination was considered to have a positive bactericidal activity when a $\geq 3 \log_{10}$ reduction in colony counts was reached.

Pharmacokinetic studies. Ampicillin and ceftriaxone were administered with a system to reproduce human serum pharmacokinetics in rabbits in order to mimic the human serum profile after an i.v. infusion of 2 g of ampicillin or ceftriaxone. A computer-controlled infusion pump system that delivered decreasing quantities of drug was employed (infusion pump, Alice King; the computer software was written by our group). This approach involved three steps: (i) estimation of ampicillin and ceftriaxone pharmacokinetic parameters in rabbits, (ii) application of a mathematical model to obtain the required infusion doses to simulate

TABLE 1. Comparison of the pharmacokinetic parameters of ampicillin^a (data from reference 19)

Parameter	Value (mean \pm SD)		
	Rabbit ($n = 8$) ^b	Human 2 g i.v. ^c	Rabbit humanlike ($n = 7$) ^d
$t_{1/2}$ (h)	0.3 ± 0.03	1.1	0.99 ± 0.08
k_{el} (h^{-1})	2.4 ± 0.29	0.63	0.71 ± 0.05
$\text{AUC}_{0-\infty}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$)	38.19	127.8	116.7 ± 31.83

^aThe pharmacokinetic parameters were estimated on the basis of an open one-compartment model.

^b $t_{1/2}$ and k_{el} data are for healthy rabbits treated with 50 mg/kg i.v. The $\text{AUC}_{0-\infty}$ was calculated from the data of an ideal profile obtained by C_0 of 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and the k_{el} of ampicillin in rabbits.

^c k_{el} , $t_{1/2}$, and $\text{AUC}_{0-\infty}$ were obtained from an ideal serum human profile of 2 g of i.v. ampicillin.

^dData are for humanlike pharmacokinetics of 2 g of ampicillin in rabbits.

human kinetics in the animals, and (iii) in vivo experimental pharmacokinetic studies, done to simulate in rabbits the pharmacokinetic profile of ampicillin and ceftriaxone in humans.

The pharmacokinetic studies which led to the humanlike pharmacokinetics of ampicillin in rabbits, including the explanation of the mathematical model used on the basis of an open one-compartment model, were previously described (19). The pharmacokinetic data of the human-adapted model of 2 g of ampicillin given i.v. in rabbits are shown in Table 1 and Fig. 1A. The serum profile and the pharmacokinetic parameters of ampicillin in rabbits administered with this model were similar to those of 2 g of i.v. ampicillin in humans.

(i) **Estimation of ceftriaxone pharmacokinetic parameters in rabbits.** To determine concentrations of ceftriaxone in serum, blood was drawn from a carotid catheter at 4, 8, 12, 16, 20, 25, 30, 45, 60, and 90 min and at 2, 2.5, 3, 3.5, 4, and 5 h after a single i.v. injection of 50 mg of ceftriaxone per kg of body weight. This study was done with eight healthy rabbits. Ceftriaxone concentrations were determined by the disk plate bioassay method (3) with *Micrococcus luteus* ATCC 9341 as the bioassay microorganism and antibiotic medium 5 (Difco Laboratories) as the growth medium. The serum samples from the rabbits were diluted with pooled rabbit serum so that their concentrations would be within the range of the standard curve. The standard samples were assayed in quintuplicate, and the serum samples were assayed in triplicate. Results were expressed as micrograms per milliliter of blood. The linearity (R^2) of the standard curve was 0.98. The sensitivity of the assay was about 1.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of sample, and the between- and within-day coefficients of variation for replicates ($n = 7$) at 1 and 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ were less than 5%.

The serum disposition constants (α_1 and β_1), the zero-time intercept for the α phase (A_1), and the zero-time intercept for the β phase (B_1) in rabbits were determined by using a nonlinear least-squares regression analysis of the concentration-time curve on the basis of an open two-compartment model.

(ii) **Application of a mathematical model to obtain the required infusion doses to simulate human kinetics of ceftriaxone, as a drug with an open two-compartment model, in the animals.** The development of the mathematical model is shown in the appendix of this article.

(iii) **In vivo experimental pharmacokinetic studies.** These studies were done to simulate in rabbits the pharmacokinetic profile of 2 g of ceftriaxone in humans. Briefly, two polyethylene catheters (inside diameter, 0.81 mm; outside diameter, 1.27 mm; Parlex SA, Hythe, Kent, England) were inserted, one through the carotid artery (sampling) and the other into the vena cava through the jugular vein (infusion), as previously described (19). The pump system was set up to deliver previously calculated flow rates of i.v. infusion to simulate the human kinetics of ceftriaxone. This study was done with five healthy rabbits.

To determine serum ceftriaxone concentrations, 2 ml of blood was sampled at 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 12, 18, and 24 h after the start of infusion, through the carotid catheter. Ceftriaxone serum concentrations were assayed by the microbiological bioassay described above.

Different pharmacokinetic parameters were estimated on the basis of an open one-compartment model to compare the pharmacokinetics of ceftriaxone in rabbits, in the human-adapted model, and in humans. The half-life at the β phase of ceftriaxone in the rabbits with humanlike pharmacokinetics ($t_{1/2}$) was calculated as $\ln 2/k_{el}$, where k_{el} is the elimination rate constant. The elimination rate constant was determined as the slope obtained from a linear regression analysis of the terminal phase of the plasma concentration-time curve on the basis of an open one-compartment model. Thereafter, the area under the concentration-time curve from 0 h to α phase ($\text{AUC}_{0-\alpha}$) was calculated as C_0/k_{el} . The pharmacokinetic parameters of ceftriaxone in humans and rabbits were calculated as described above with a C_0 of 256.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Establishing endocarditis and installation with the infusion pump system. Experimental aortic valve infective endocarditis was induced in New Zealand rabbits (weight, approximately 2 to 2.1 kg) by the method of Garrison and

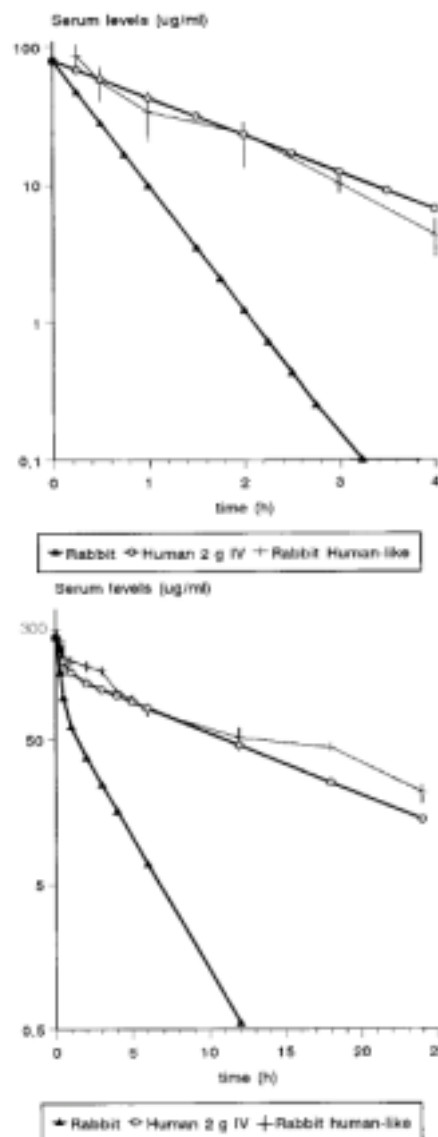


FIG. 1. Results of the pharmacokinetic studies with rabbits with humanlike pharmacokinetics of 2 g of ampicillin (A) or 2 g of ceftriaxone (B).

Freedman (17), as modified by Durack and Beeson (10). The induction of nonbacterial thrombotic endocarditis was done as previously described (18, 19). Briefly, a polyethylene catheter was inserted through the right carotid artery into the left ventricular cavity and was left in place throughout the experiment. The same day, one or two catheters (inside diameter, 0.81 mm; outside diameter, 1.27 mm; Portex SA), depending on the treatment group, were placed into the inferior vena cava through the jugular vein by the same technique described previously (19), to administer ampicillin and ceftriaxone treatment. The infusion pump system was set up to deliver 2 ml of 0.9% saline per h to keep the catheter open until the beginning of antimicrobial administration. Twenty-four hours after placement of the intra-aortic catheter, different groups of animals were inoculated via the jugular catheter with 1 ml of saline containing either 10^8 CFU of *E. faecalis* V45 or 10^7 CFU of *E. faecalis* V48 in the stationary phase of growth. The presence of endocarditis was confirmed by a blood culture yielding enterococci, obtained before starting antimicrobial therapy.

Treatment groups and estimation of therapeutic efficacy. Antimicrobial therapy was initiated 48 h after infection and was continued for 3 days. The rabbits infected with either strain were randomized into the following treatment groups: group 1, control without treatment; group 2, ampicillin humanlike pharmacoki-

A

TABLE 2. Susceptibilities to antibiotics of 10 high-level aminoglycoside-resistant *E. faecalis* strains and synergy by the double disk method

<i>E. faecalis</i> strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^a			Synergy by double disk method
	Ampicillin	Ceftriaxone	Ampicillin-ceftriaxone ^b	
E51	2	1,024	0.25	+
E61	2	>1,024	0.5	+
V45	1	512	0.5	+
E365	4	1,024	2	+
E74	2	1,024	0.5	+
E81	4	>1,024	2	+
E10	4	>1,024	1	+
E78	2	1,024	0.5	+
E17	2	1,024	0.5	+
V48	1	256	0.06	+

^a MIC determined by the agar dilution method.

^b MIC of ampicillin in MHA with 4 μg of ceftriaxone per ml.

netics, 2 g every 4 h i.v.; group 3, ampicillin humanlike pharmacokinetics, 2 g every 4 h i.v. plus ceftriaxone humanlike pharmacokinetics, 2 g every 12 h.

After 3 days of treatment, the animals were sacrificed 6 h after ending the ampicillin and ceftriaxone infusion with a lethal i.v. injection of sodium pentothal. The chest was opened, the heart was excised and opened, and the aortic valve vegetations were removed aseptically. The animals included in the control group were sacrificed 48 h after induction of infection. The vegetations were rinsed with saline, weighed, and homogenized in 2 ml of tryptic soy broth (Difco Laboratories) in a tissue homogenizer (Stomacher 80). Homogenates were quantitatively cultured onto 5% sheep blood Columbia agar plates. The plates were incubated for 48 h at 37°C in room air. Results were expressed as the \log_{10} CFU of *E. faecalis* V45 or V48 per gram of vegetation. Bacterial densities in valvular vegetations, calculated to be between 0 and 2 log CFU/g, were reported as \log_{10} 2 CFU/g rather than 0 because of potential errors associated with the low weight of the valvular tissue.

Analysis of results. Results were expressed as the means, 95% confidence intervals of the means of grams of vegetations and \log_{10} CFU of *E. faecalis* per gram of vegetation, and number of animals with sterile vegetations. Differences in \log_{10} CFU of enterococci per gram of vegetation and the size of the vegetations (in grams) were compared by one-way analysis of variance. When the *F* value was significant, each treatment group was compared with the control group and with each of the other treatment groups by Scheffe's test. Comparisons between the number of animals with sterile vegetations were made by Fisher's exact test. *P* values equal to or less than 0.05 were considered significant.

B

RESULTS

In vitro antibiotic susceptibility tests. MICs of ampicillin and ceftriaxone were determined by the agar dilution method for the 10 *E. faecalis* clinical strains used in the study (Table 2). All strains were ampicillin susceptible (MIC, 1 to 4 $\mu\text{g/ml}$) and ceftriaxone resistant (MIC, \approx 256 $\mu\text{g/ml}$). The bactericidal effects of different ampicillin concentrations on the 10 strains tested after 24 h of incubation are shown in Table 3. The efficacy of intermediate ampicillin concentrations in reducing the number of viable cells was frequently higher than the efficacy of high concentrations. This result was consistently found in eight isolates and confirmed in three replicate experiments. The highest bactericidal effects were obtained at concentrations ranging from two to eight times the MIC. The window of ampicillin bactericidal activity in the different strains (reduction in viable bacterial counts exceeded 99.9%) corresponded to antibiotic concentrations ranging from 2 to 16 $\mu\text{g/ml}$. The bactericidal effect was not more detectable at ampicillin concentrations ranging from 4 to 32 times the MIC (8 to 32 $\mu\text{g/ml}$). All the *E. faecalis* strains showed high levels of resistance to gentamicin, tobramycin, kanamycin, and streptomycin, with MICs of \approx 2,000 $\mu\text{g/ml}$. The presence of the *aph*(2'')-*aac*(6') and the *aph*(3'')-III genes was confirmed in all strains by the PCR method.

TABLE 3. Activity of different ampicillin concentrations with HLRAg *E. faecalis* strains

<i>E. faecalis</i> strain	Ampicillin MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^a	Change in log ₁₀ CFU/ml at different ampicillin concns ($\mu\text{g/ml}$) ^b								
		1	2	4	8	16	32	64	128	
E51	1	-0.6	-3.4	-4.6	-4.2	-3.8	-1.7	-1.7	-1.7	-1.6
E61	2		-1.5	-3.8	-3.7	-1.9	-1.5	-1.7	-1.7	-1.7
V45	0.5	-2.8	-4.0	-4.1	-2.3	-2.3	-2.7	-2.4	-2.4	-2.2
E365	2		-1.7	-4.1	-2.3	-2.6	-2.4	-2.6	-2.6	-2.7
E74	1	-0.9	-3.6	-4.2	-4.1	-2.8	-2.3	-2.4	-2.4	-2.4
E81	2		-0.8	-2.0	-2.2	-2.2	-2.3	-2.8	-2.8	-2.8
E10	2		-0.8	-2.7	-2.8	-3.4	-2.6	-2.2	-2.2	-2.4
E78	2		-0.3	-4.1	-4.2	-1.7	-2.8	-3.9	-4	-4
E17	1	-0.5	-2.4	-2.9	-3.4	-3.1	-2.8	-2.8	-2.8	-2.5
V48		-0.7	-2.7	-2.8	-4.2	-3.8	-2.6	-2.3	-2.3	-2.3

^a MIC determined by microdilution method in MHB.

^b Change in log CFU per milliliter from the initial inoculum (24 h at 37°C). Boldface indicates window of bactericidal effect.

Synergy studies. A reduction of 1 to 4 dilutions in ampicillin MICs was obtained when ampicillin was combined with a fixed subinhibitory ceftriaxone concentration of 4 $\mu\text{g/ml}$. This potentiating effect was also observed by the double disk method for all 10 strains (Table 2). When MICs were determined by the microdilution method in cation-adjusted MHB, ampicillin MICs were approximately 1 dilution lower (Table 3).

The results of the time-kill studies performed with 1 and 2 μg of ampicillin per ml alone or in combination with 5, 10, 20, 40, and 60 μg of ceftriaxone per ml are shown in Table 4. After 4 h of contact, ampicillin alone produced a bacteriostatic effect (≤ 0.3 log increase with respect to the original inoculum) in 4 of 10 strains with 1 μg of ampicillin per ml and in 9 of 10 with 2 $\mu\text{g/ml}$; similar data were obtained after 24 h: 3 of 10 and 9 of 10, respectively. At concentrations ranging from 5 to 60 $\mu\text{g/ml}$, ceftriaxone alone did not significantly alter the original bacterial count at 4 or 24 h. After 24 h of incubation, a ≥ 2 log₁₀ decrease in CFU per milliliter between ceftriaxone plus ampi-

illin and ampicillin alone was found for all 10 *E. faecalis* strains studied. At 24 h, the majority of the ampicillin-ceftriaxone combined concentrations (70%) produced this effect, and in 36%, a bactericidal effect was observed (≥ 3 log₁₀ killing with respect to the initial inoculum). Note that ceftriaxone alone did not affect the enterococcal bacterial counts after 24 h of incubation but slightly influenced the slope of the bacterial growth curve for eight strains, as shown in the 4-h counts. Thus, in these cases, the requirements for a strict definition of synergy were not fulfilled, but the results certainly suggest a situation similar to true synergy. This strong antimicrobial cooperation between the two drugs was obtained in seven strains with the combination of 2 μg of ampicillin per ml plus 10 μg of ceftriaxone per ml and in six strains with 5 μg of ceftriaxone per ml. After only 4 h of incubation, one-third of the ampicillin-ceftriaxone combined concentrations produced significant reductions in bacterial counts (≥ 2 log₁₀ with respect to ampicillin alone or to the initial inoculum) in 9 of the 10 strains.

TABLE 4. Results of time-kill experiments with 10 HLRAg *E. faecalis* strains

Antimicrobial agent ^a	Change in log ₁₀ CFU/ml ^b for strain:																			
	E10		E17		E51		E74		E78		V48		E365		V45		E81		E61	
	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h
Growth control	+1.5	+1.8	+1.7	+2	+1.9	+2.3	+2.0	+2.3	+1.9	+2.4	+1.2	+2.1	+1.7	+2.0	+0.7	+1.8	+1.6	+1.9	+1.7	+2.1
A (1)	-0.2	+0.8	+0.8	+0.3	+1	+0.8	+0.1	+1.3	+1.8	+2.2	-0.3	+0.8	+1	+0.2	+1.15	+0.5	+0.2	-2	+1	+1
A (2)	-0.4	-0.6	-0.1	-2.2	-0.1	-0.1	-1	-1.2	-0.8	+0.8	-2.5	-0.9	+0.2	-1	-1.5	+0.2	+0.5	0	+0.1	-1
C (5)	+0.7	+2.0	+0.9	+2.1	+0.4	+1.7	+0.5	+1.7	+0.6	+1.9	+0.7	+1.9	+0.6	+1.8	+0.8	+1.9	+0.7	+1.7	+0.8	+1.8
C (10)	+0.5	+1.9	+0.5	+1.9	+0.6	+1.6	+0.6	+1.8	+0.7	+1.7	+0.9	+2.0	+0.8	+2.0	+0.9	+2.0	+0.6	+1.8	+0.7	+1.9
C (20)	+0.7	+2.1	+0.7	+2.0	+0.4	+1.8	+0.4	+1.9	+0.5	+1.7	+1.1	+2.1	+0.7	+1.9	+0.7	+1.9	+0.5	+1.7	+0.7	+1.7
C (40)	+0.7	+1.8	+0.7	+1.9	+0.4	+1.7	+0.7	+1.7	+0.8	+1.8	+0.95	+1.9	+0.8	+1.7	+0.8	+1.8	+0.6	+1.9	+0.6	+1.9
C (60)	+0.6	+1.9	+0.8	+1.8	+0.5	+1.6	+0.5	+1.9	+0.5	+1.7	+1.2	+2.3	+0.6	+1.8	+0.7	+2.1	+0.8	+2.0	+0.5	+2.0
A (1) + C (5)	-0.6	-1.7	+0.3	-2.6	-1.0	-1	-1.8	-1.9	+1.8	+2.1	-2.9	-2.7	+0.6	-1	-2.9	+0.2	+0.3	-3	+1	-1.7
A (1) + C (10)	-0.9	-2	+0.4	-2.3	-1.1	-2.1	-1.8	-2.2	+1.7	+2.3	-3.1	-2.8	+0.5	-1	-3.1	-2.0	+0.1	-2.5	+1	-1.9
A (1) + C (20)	-0.8	-2	+0.3	-2.5	-0.9	-2.2	-2	-2.2	+1.9	+2.1	-3.0	-2.7	+0.7	-2.3	-2.8	-2.2	+0.3	-2.4	+1	-1.7
A (1) + C (40)	-0.7	-2.3	-2.3	-2.3	-1.1	-2.2	-1.9	-2.3	-0.4	+1	-2.9	-3.0	-0.7	-2.3	-3.0	-2.1	-0.4	-3	+1	-2
A (1) + C (60)	-1	-2.3	-1.5	-2.5	-1.0	-2.2	-1.9	-2.3	-0.4	+1.2	-2.8	-2.7	-1	-2.3	-2.6	-2.3	-0.4	-3	+1	-2
A (2) + C (5)	-0.9	-2.4	-2.7	-2.3	-2.9	-2.5	-2.1	-3.2	-2	-3	-2.9	-4.0	-1	-2.3	-3.0	-2.5	-0.1	-1.2	-2	-3.5
A (2) + C (10)	-1.1	-2.2	-3	-4.1	-2.9	-3.2	-2.1	-3.3	-2	-2	-3.2	-4.8	-2.4	-4.2	-3.2	-3.9	-0.2	-1.2	-2	-3.4
A (2) + C (20)	-0.9	-3	-3	-3.3	-2.9	-3.7	-2	-3.3	-2	-2.6	-3.0	-4.5	-2.4	-2.8	-3.1	-4.4	-1.7	-1.4	-2	-4
A (2) + C (40)	-1.3	-3.5	-2.5	-4.3	-2.9	-4.1	-1.9	-3.3	-2	-2.3	-3.1	-4.6	-2.5	-3	-2.9	-4.6	-1.7	-1.8	-2.2	-4
A (2) + C (60)	-1.7	-3.4	-2.6	-4.3	-2.7	-4	-2	-3.2	-1.9	-2.3	-2.8	-4.5	-2.6	-2.8	-2.9	-2.1	-1.9	-2.4	-2	-3

^a Change in log₁₀ CFU per milliliter from the initial inoculum.

^b A, ampicillin; C, ceftriaxone. Numbers in parentheses are micrograms per milliliter.

TABLE 5. Comparison of the pharmacokinetic parameters of ceftriaxone^a

Parameter	Value (mean ± SD)		
	Rabbit (n = 8) ^b	Human 2 g i.v. ^c	Rabbit humanlike (n = 8) ^d
t _{1/2} (h)	1.66 ± 0.15	6.92	7.21 ± 0.19
k _{el} (h ⁻¹)	0.4 ± 0.04	0.1	0.09 ± 0.002
AUC _{0-∞} (μg · h/ml)	260.72	1,506.3	1,819 ± 82.72

^a The pharmacokinetic parameters were estimated on the basis of an open one-compartment model.

^b t_{1/2} and k_{el} data are for healthy rabbits treated with 50 mg/kg i.v. The AUC_{0-∞} was calculated from the data of an ideal profile obtained by C₀ of 256.3 μg/ml and the k_{el} of ceftriaxone in rabbits. Data were obtained from the work Patel et al. (33).

^c k_{el}, t_{1/2}, and AUC_{0-∞} were obtained from an ideal serum human profile of 2 g of ceftriaxone.

^d Data are for humanlike pharmacokinetics of 2 g of ceftriaxone in rabbits.

Pharmacokinetic studies. The rabbit pharmacokinetic data of ceftriaxone that we used in the mathematical model, determined with eight healthy rabbits that had received one i.v. bolus dose of 50 mg/kg, were as follows (shown as means ± standard deviations [SD]): α_e, 3.7 ± 0.41 h⁻¹; β_e, 0.42 ± 0.07 h⁻¹; k₂₁, 1.53 ± 0.3 h⁻¹; k₁₂, 1.07 ± 0.3 h⁻¹; and V_e, 0.16 ± 0.01 liters/kg. The profile in human serum produced by a 2-g i.v. injection of ceftriaxone was simulated in rabbits with the controlled-infusion pump system (Fig. 1B). This resulted in peak and trough ceftriaxone levels in rabbit serum (mean ± SD) of 242.7 ± 17.6 μg/ml at 15 min and 21.6 ± 2.9 μg/ml at 24 h, respectively (Fig. 1B). The pharmacokinetic parameters obtained from the human-adapted model were similar to those of 2 g of i.v. ceftriaxone in humans (Table 5). We carried out pharmacokinetic studies of ampicillin and ceftriaxone after six repeated injections of ampicillin and four of ceftriaxone in healthy rabbits and found no significant differences with respect to the results presented in Fig. 1.

Treatment of established endocarditis. Results of therapy of experimental endocarditis caused by *E. faecalis* V48 are shown in Table 6. After 3 days of treatment, residual bacterial titers in the cardiac vegetations were significantly lower in the treated animals than in the controls (*P* < 0.0001). Comparisons between the treated groups revealed that the combination of ampicillin with ceftriaxone was significantly more effective than ampicillin alone in reducing the number of bacteria in the vegetations (*P* < 0.001). The mean log₁₀ CFU per gram of vegetation in the group receiving ampicillin plus ceftriaxone was 6.3 less than that of the control group and 3.7 less than that of the ampicillin group. Likewise, the size of the vegetations of

the animals treated with the combination was significantly less than that found in the animals treated with ampicillin alone (*P* = 0.0001). None of the animals had sterile vegetations.

In the animals with endocarditis due to *E. faecalis* V45, the treatment with ampicillin plus ceftriaxone was even more effective (Table 6). Ceftriaxone plus ampicillin was more effective than ampicillin alone in reducing enterococcal vegetation counts (*P* < 0.0001). Therefore, no animal treated with ampicillin alone had sterile vegetations, whereas treatment with ampicillin plus ceftriaxone resulted in sterilization of all the infected valves in 47% of the animals (8 of 17) with endocarditis due to *E. faecalis* V45 (*P* < 0.001). In order to study the possible antibiotic carryover effect, a microbiological bioassay of the homogenates with *Micrococcus* as the bioassay microorganism was carried out, and no traces of ampicillin or ceftriaxone were found. It is unlikely that *E. faecalis* (V45 or V48) growth inhibition could be produced by possible traces of ampicillin and ceftriaxone 6 h after final infusion, since they were unable to inhibit *M. luteus* growth. Moreover, taking into account that the trough concentration of ampicillin is 4 μg/ml and the trough concentration of ceftriaxone is 30 μg/ml, and the k_{el} of ampicillin and ceftriaxone are 2.4 and 0.4 h⁻¹, respectively, at 6 h after terminating infusion of the drugs, the concentrations in serum in the animals at the moment of sacrifice would be 0.000002 μg of ampicillin per ml and <2 μg of ceftriaxone per ml, levels that do not inhibit *E. faecalis* growth.

DISCUSSION

The first purpose of this study was to describe a mathematical model that determines the doses to be given to animals by a computer-controlled infusion pump system to obtain serum profiles in the rabbit similar to those observed in humans after i.v. administration of 2 g of ceftriaxone. In previous studies performed in our laboratory (19), we developed a model of humanlike pharmacokinetics to be used for drugs with an open one-compartment pharmacokinetic model (e.g., ampicillin). The results of the present study show that the model we developed is simple and adaptable for simulating the human pharmacokinetics of antimicrobials with an open two-compartment model.

It is a widespread belief that enterococci are naturally tolerant of the bactericidal effect of β-lactam agents, even though occasional nontolerant strains have been found (22). In this work, when the antibiotic effect of ampicillin was studied at various concentrations, a bactericidal effect (>3 log decrease in colony count) was found in 9 of 10 of our strains but only in a narrow range of ampicillin concentrations. In fact, in six of nine of these strains, this bactericidal window was shown only

TABLE 6. Treatment of experimental endocarditis caused by *E. faecalis* V48 or V45 with a humanlike profile of ampicillin alone or in combination with ceftriaxone

Treatment group	<i>E. faecalis</i> V48			<i>E. faecalis</i> V45			
	No. dead/ no. total (%)	Wt of vegetation (g) ^b	Log CFU/g of vegetation ^c	No. dead/no. total (%)	No. sterilized/ no. survived (%)	Wt of vegetation (g)	Log CFU/g of vegetation
Control	3/12 (25)		11.6 ± 1	3/12 (25)			10.5 ± 0.4
Ampicillin ^d	6/19 (31)	0.12 ± 0.057	7.9 ± 1.7 ^e	4/20 (20)	0/16 (0)	0.0607 ± 0.01	6.0 ± 1.4 ^e
Ampicillin ^d + ceftriaxone ^e	3/17 (18)	0.067 ± 0.024 ^d	5.3 ± 0.6 ^e	3/20 (15)	8/17 (47) ^f	0.0421 ± 0.02	3.1 ± 1.3 ^e

^a Ampicillin, 2 g/4 h i.v. at humanlike pharmacokinetics; ceftriaxone, 2 g/12 h at humanlike pharmacokinetics.

^b Results are shown as means ± SD.

^c *P* < 0.0001 versus control.

^d *P* < 0.0001 versus ampicillin.

^e *P* < 0.001 versus ampicillin.

^f *P* < 0.001 versus ampicillin.

with one or two of all the ampicillin concentrations tested. At ampicillin concentrations above this bactericidal window, there is a predominant static effect (nonbactericidal) in the tested isolates. If only these concentrations were tested, all strains could be considered classically tolerant. Indeed, the skipped tubes tend to be ignored in most MBC determinations. The existence of a bactericidal window for most *E. faecalis* strains has been previously described by other groups for penicillin and amoxicillin (15, 16, 30). Interestingly, tolerance may have been developed by intermittent challenge with β -lactams (22). Experiments by our group suggest that pulse-exposure and, particularly, stepwise graded concentration regimens may produce a local selection of tolerant variants in local compartments with high and/or low concentrations, in this way closing the bactericidal window (4).

The data obtained in this study suggest that the association of ampicillin and ceftriaxone may show in vitro synergism against *E. faecalis* with HLRAg. In all of the tested *E. faecalis* isolates, a strong antibacterial cooperation between ampicillin and ceftriaxone was detectable with a $\approx 2 \log_{10}$ decrease in CFU per milliliter between the combination and its most active agent alone after 24 h. The results may indicate that the combination could be useful in the infections caused by HLRAg *E. faecalis* strains. It can be suggested that nonbactericidal ampicillin concentrations move into the bactericidal range by association with ceftriaxone, enlarging the range of ampicillin's bactericidal effect. This synergistic effect has been previously detected by Mainardi et al. (30) with amoxicillin and cefotaxime; these authors proposed that, at low amoxicillin concentrations, the low-molecular-weight penicillin-binding proteins (PBPs) 4 and 5 would be partially saturated, but the nonessential PBPs 2 and 3 could participate in building the cell wall; the combination with cefotaxime would totally saturate PBPs 2 and 3, producing the bactericidal synergistic effect. At higher concentrations, ampicillin alone may be able to inhibit the function of PBPs 4 and 5, producing an optimal bactericidal effect. Beyond a given (high) concentration, ampicillin could inhibit autolysins, again reducing bacteriolysis, as was suggested by Fontana et al. (15). Other β -lactam and/or β -lactam associations may produce a similar effect; for instance, an increase in the bactericidal effect of ampicillin by combination with imipenem in *Enterococcus faecium* has been recently reported (7). We were unable to find any synergistic activity between ampicillin and ceftriaxone against *E. faecium* (41), confirming previous results of Mainardi et al. (30).

In this work, all *E. faecalis* strains were significantly killed by low concentrations of ampicillin (1 or 2 $\mu\text{g/ml}$) when ceftriaxone was associated with it. The rate of killing was generally higher with 2 than with 1 μg of ampicillin per ml, independently of the ceftriaxone concentration, suggesting that the main bactericidal activity was due to ampicillin. It is important to note that strong antimicrobial cooperation and a bactericidal effect were obtained at low ampicillin concentrations, similar to those expected to be reached at the heart valve vegetations.

In rabbits, after 3 days of treatment, the ampicillin-ceftriaxone combination was more effective than ampicillin alone in decreasing the size of the vegetations and the bacterial concentrations of HLRAg *E. faecalis* inside the vegetations. Therefore, it is remarkable that close to half the animals infected by the V45 strain had no detectable CFU in their vegetations at the end of treatment with the combination. There is, thus, total accordance between the in vitro and the in vivo studies. In the animal model, ampicillin alone can decrease the enterococcal bacterial count from the valve, but to a much lesser extent than it can in the presence of ceftriaxone. It could

be considered that the period during which the ampicillin concentrations needed for optimal killing are available in the host is too short to be effective. It is well known that β -lactam killing activity is proportional to the time of exposure (AUC) (24). Ceftriaxone, enlarging the range of ampicillin's bactericidal concentrations, increases the period during which these concentrations are available, and thus increased bactericidal activity is expected to occur. Our results in the treatment of experimental endocarditis due to *E. faecalis* with ampicillin alone are not comparable to those of other studies mainly because we use humanlike pharmacokinetics of ampicillin which mimic an i.v. administration of 2 g every 4 h, and no other studies use this technique. The amount of drug, the time above MIC, the AUC, and the shape of this AUC are totally different from those for the administration of the drug with animal pharmacokinetics every 8 or 12 h as used in the other studies (21, 40), and as would be expected, the efficacy in our study was superior. In our study, ampicillin alone provided an important reduction of bacterial titers in the vegetations, but the combination was significantly superior.

Therapy of endocarditis due to HLRAg *E. faecalis* remains controversial. To date, there is no known effective medical treatment for patients with endocarditis in whom the infecting strain of *E. faecalis* is susceptible to ampicillin but highly resistant to aminoglycosides. Recently, Venditti et al. (44) described a patient with endocarditis due to HLRAg *E. faecalis* for whom treatment with ampicillin plus ceftriaxone failed. One possible explanation for this failure is that ceftriaxone had to be stopped after 3 weeks because of fever related to the administration of the drug. We have successfully treated two patients, one with the ampicillin-ceftriaxone combination and the second with cefotaxime instead of ceftriaxone, the case being a human immunodeficiency virus-infected patient with cholangitis due to *Cryptosporidium* spp. that precluded the use of ceftriaxone (2).

In conclusion, the results presented here show that strain-independent in vitro bactericidal synergism occurred against HLRAg *E. faecalis*. Likewise, in the treatment of HLRAg *E. faecalis*-induced experimental endocarditis, ceftriaxone combined with ampicillin, both given with humanlike kinetics of 2 g every 12 h and 2 g every 4 h, was an effective therapeutic choice, but it remains to be seen if this is going to be translated into superior clinical results. Further studies are needed to establish the efficacy of this combination in humans with HLRAg enterococcal endocarditis.

APPENDIX

Development of the mathematical model. The aim of this mathematical model was to determine the doses that would obtain the desired humanlike pharmacokinetics of ceftriaxone on the basis of an open two-compartment model in the animals.

The system we used to imitate human kinetics in rabbits is based on the administration of decreasing quantities of drug to counteract the higher elimination rate in the animal.

(a) To estimate the zero-time intercept for the α phase (A_k) and the zero-time intercept for the β phase (B_k) in humans for a maximum concentration of ceftriaxone (C_{max}) in serum after a dose of 2 g in humans ($C_{\text{max}} = 256.9 \mu\text{g/ml}$) (32), we used the following second-degree equation. For practical reasons, we have used C_{max} as C_{hr}

$$C_{\text{max}} = C_{\text{hr}} = A_k + B_k$$

$$k_{21k} = (A_k \cdot \beta_k + B_k \cdot \alpha_k) / (A_k + B_k)$$

in which β_k , α_k , and k_{21k} are known human constants, was calculated from the work of Patel et al. (33).

(b) At the end of the distribution phase (α phase), we estimated the concentration of the drug (C_d) necessary to reach the human concen-

tration at the end of the α phase (C_{α}) by subtracting it from the estimated serum level in animals (C_{α}):

$$C_{\alpha} = C_{\alpha} - C_{\alpha}$$

in which

$$C_{\alpha} = A_{\alpha} \cdot e^{-k_{12} \cdot t_{\alpha}} + B_{\alpha} \cdot e^{-\beta \cdot t_{\alpha}}$$

$$C_{\alpha} = A_{\alpha} \cdot e^{-k_{12} \cdot t_{\alpha}} + B_{\alpha} \cdot e^{-\beta \cdot t_{\alpha}}$$

in which t_{α} = time value of α phase in animals (hours), A_{α} = zero-time intercept for the α phase in rabbits (micrograms per milliliter) for $C_0 = 250 \mu\text{g/ml}$, and B_{α} = zero-time intercept for the β phase in rabbits (micrograms per milliliter) for $C_0 = 250 \mu\text{g/ml}$.

In order to find A_{α} and B_{α} , we used the following second-degree equation:

$$C_{\alpha} = C_{\max} - A_{\alpha} + B_{\alpha}$$

$$k_{21\alpha} = (A_{\alpha} \cdot \beta_1 + B_{\alpha} \cdot \alpha_1) / (A_{\alpha} + B_{\alpha})$$

in which β_1 , α_1 , and $k_{21\alpha}$ are known rabbit constants obtained previously.

(c) We divided the elimination phase (β phase) into time periods (T_1, T_2, \dots, T_n). At the final limit point of each time period (T_n), the serum drug level is higher in human kinetics (C_{α}) than in rabbit kinetics (C_{α}). We determined the concentration of the drug ($C_{\alpha}, C_{\alpha}, \dots, C_{\alpha}$) required to counterbalance this difference by subtracting the desired concentration ($C_{\alpha}, C_{\alpha}, \dots, C_{\alpha}$) from the estimated serum level in the animal ($C_{\alpha}, C_{\alpha}, \dots, C_{\alpha}$) by the following mathematical formula, where x = number of the period:

$$\text{for } T_1, \quad C_{\alpha} = C_{\alpha} - C_{\alpha}$$

$$\text{for } T_2, \quad C_{\alpha} = C_{\alpha} - C_{\alpha}$$

$$\text{in which } C_{\alpha} = A_{\alpha} \cdot e^{-k_{12} \cdot t_{\alpha}} + B_{\alpha} \cdot e^{-\beta \cdot t_{\alpha}}, \quad C_{\alpha} = C_{\alpha} \cdot e^{-k_{12} \cdot T_1}$$

$$C_{\alpha} = A_{\alpha} \cdot e^{-k_{12} \cdot t_{\alpha}} + B_{\alpha} \cdot e^{-\beta \cdot t_{\alpha}}, \quad C_{\alpha} = C_{\alpha} \cdot e^{-k_{12} \cdot T_2}$$

Thus, the general formula for $T_x = 1, 2, 3, \dots, \text{infinity}$ is:

$$C_{\alpha} = (A_{\alpha} \cdot e^{-k_{12} \cdot t_{\alpha}} + B_{\alpha} \cdot e^{-\beta \cdot t_{\alpha}}) - (C_{\alpha} \cdot e^{-k_{12} \cdot T_x})$$

in which T_x = time value between periods. Time period is in hours; t_{α} = time in human kinetics (hours); and k_{12} = rabbit elimination rate constant from the central compartment (per hour).

(d) The amount of drug (Q_{α} , in milligrams per hour) that must be given by continuous i.v. infusion during the entire length of the α phase (t_{α}) and the time periods (T_x) of the β phase to attain the desired concentration at the end of the t_{α} (C_{α}) or at the end of T_x (C_{α}) was determined by the following mathematical fraction:

for α phase,

$$Q_{\alpha} = C_{\alpha} \cdot k_{12} \cdot V_r \cdot W_r / \{ [1 + [(\beta_1 - k_{12}/\alpha_1 - \beta_1) \cdot e^{-\alpha_1 \cdot t_{\alpha}}] + [k_{12} - \alpha_1/\alpha_1 - \beta_1] \cdot e^{-\beta_1 \cdot t_{\alpha}}] \}$$

for β phase,

$$Q_{\alpha} = C_{\alpha} \cdot k_{12} \cdot V_r \cdot W_r / \{ [1 + [(\beta_1 - k_{12}/\alpha_1 - \beta_1) \cdot e^{-\alpha_1 \cdot T_x}] + [k_{12} - \alpha_1/\alpha_1 - \beta_1] \cdot e^{-\beta_1 \cdot T_x}] \}$$

in which Q_{α} = quantity of drug to be administered during T_x (milligrams per hour), V_r = volume of distribution of the drug in rabbits (liters per kilogram), and W_r = animal weight (kilograms).

(e) The infusion rate (V_r , in milliliters per hour) to use during the time period (T_x) in order to administer Q_{α} depends on the concentration of the drug solution used (S , in milligrams per milliliter): $V_r = Q_{\alpha}/S$.

(f) The first i.v. dose was determined by the following formula:

$$V_x = C_0 \cdot k_{12} \cdot V_r \cdot W_r / \{ [1 + [(\beta_1 - k_{12}/\alpha_1 - \beta_1) \cdot e^{-\alpha_1 \cdot T_x}] + [k_{12} - \alpha_1/\alpha_1 - \beta_1] \cdot e^{-\beta_1 \cdot T_x}] \cdot S \}$$

in which C_0 is the maximum concentration of ceftriaxone.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Celine Cavallo for English-language assistance.

This work was supported in part by Fondo Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FISS grant no. 96/0057-00) and Hospital General Vall d'Hebron [grant no. PR(HG) 67/97].

REFERENCES

- Almirante, B., M. P. Tornos, M. Gargul, M. Pujol, and J. M. Miró. 1991. Prognosis of enterococcal endocarditis. *Rev. Infect. Dis.* 13:1248-1249.
- Almirante, B., J. Gavaldà, M. P. Tornos, E. Ribera, and A. Pabissa. 1997. Effectiveness of ampicillin plus ceftriaxone or cefotaxime in the treatment of high-level aminoglycoside resistant (HLAR) *Enterococcus faecalis* infective endocarditis, abstr. 179, p. 179. In Program and abstracts of the Fourth International Symposium on Modern Concepts in Endocarditis and Cardiovascular Infections, Yverdon-Les-Bains, Switzerland.
- Anhalt, J. P. 1985. Antimicrobial assays, p. 691-729. In J. A. Washington II (ed.), Laboratory procedures in clinical microbiology. Springer-Verlag, New York, N.Y.
- Baquero, F., and M. C. Negri. 1997. Selective compartments for resistant microorganisms in antibiotic gradients. *Biossays* 19:731-736.
- Barrolo, A., S. Stefan, A. Orsi, A. Nicolini, A. R. DiBona, and F. Paradisi. 1992. High-level aminoglycoside resistance among enterococci isolated from blood cultures. *J. Antimicrob. Chemother.* 29:729-731.
- Blatter, M., U. Flockinger, J. Fentzen, M. P. Glauser, and P. Francioli. 1993. Simulated human serum profiles of one daily dose of ceftriaxone plus netilmicin in treatment of experimental streptococcal endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31:971-976.
- Brandt, C. M., M. S. Rouse, N. W. Lane, N. W. Stratton, W. R. Wilson, and J. M. Steckelberg. 1996. Effective treatment of multidrug-resistant enterococcal experimental endocarditis with combinations of cell wall-active agents. *J. Infect. Dis.* 173:909-913.
- Cercunado, E., G. M. Eliopoulos, C. B. Wennersten, and R. C. Moellering, Jr. 1992. Influence of high-level gentamicin resistance and beta-hemolysis on susceptibility of enterococci to the bactericidal activities of ampicillin and vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:2526-2528.
- Das, S. S., J. R. Anderson, A. A. Macdonald, and K. W. Somerville. 1994. Endocarditis due to high level gentamicin resistant *Enterococcus faecium*. *J. Infect.* 28:185-191.
- Durack, D. T., and P. B. Beeson. 1972. Experimental bacterial endocarditis. I. Colonization of a sterile vegetation. *Br. J. Exp. Pathol.* 53:44-49.
- Eliopoulos, G. M., C. Wennersten, S. Zigelboim-Danna, S. Reiszner, F. Goldman, and R. C. Moellering, Jr. 1988. High-level resistance to gentamicin in clinical isolates of *Streptococcus (Enterococcus) faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32:1528-1532.
- Eliopoulos, G. M. 1996. Antibiotic resistance in *Enterococcus* species: an update, p. 21-51. In J. S. Remington and M. N. Swartz (ed.), Current clinical topics in infectious diseases. Blackwell Science, Inc., Boston, Mass.
- Facklam, R. R., and M. D. Collins. 1989. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J. Clin. Microbiol.* 27:731-734.
- Fernandez-Garcerra, M. L., C. Barros, J. L. Rodriguez Tudela, R. Fernandez Roblas, and F. Soriano. 1988. Aortic endocarditis caused by gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 7:525-527.
- Fontana, R., M. Bozzetti, A. Grossato, E. A. Tonin, M. M. Liew, and G. Satta. 1990. Paradoxical response of *Enterococcus faecalis* to the bactericidal activity of penicillin is associated with reduced activity of one autolysin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:314-320.
- Fontana, R., A. Grossato, M. Ligotti, and E. A. Tonin. 1990. In vitro response to bactericidal activity of cell wall-active antibiotics does not support the general opinion that enterococci are naturally tolerant to these antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:1518-1522.
- Garrison, P., and L. R. Freedman. 1970. Experimental endocarditis. I. Staphylococcal endocarditis in rabbits resulting from placement of a polyethylene catheter in right side of the heart. *Yale J. Biol. Med.* 42:394-410.
- Gavaldà, J., A. Pabissa, B. Almirante, M. Laguarda, E. Crespo, L. Post, and F. Fernández. 1995. Effect of gentamicin dosing interval on therapy of viridans streptococcal experimental endocarditis with gentamicin and penicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:2098-2103.
- Gavaldà, J., P. J. Cardona, J. A. Capdevila, M. Laguarda, B. Almirante, C. Pígan, E. Crespo, and A. Pabissa. 1996. Treatment of experimental endocarditis due to *Enterococcus faecalis* using once-daily dosing regimen of gentamicin plus simulated profiles of ampicillin in human serum. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:173-178.
- Gavaldà, J., J. A. Capdevila, C. Torres, M. Laguarda, C. Tenorio, J. de Otero, and A. Pabissa. 1996. Efficacy of ampicillin (A) and ceftriaxone (C) in the treatment of experimental endocarditis due to *Enterococcus faecalis* highly-resistant to aminoglycosides, abstr. B004, p. 33. In Abstracts of the 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Hellinger, W. C., M. S. Rouse, P. M. Rabaudan, N. K. Henry, J. M. Steckelberg, and W. R. Wilson. 1992. Continuous intravenous versus intermittent

- ampicillin therapy of experimental endocarditis caused by aminoglycoside-resistant enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:1272-1275.
22. Hodges, T. L., S. Zigelboim-Damm, G. M. Eliopoulos, C. Wernervsten, and R. C. Moellering, Jr. 1992. Antimicrobial susceptibility changes in *Enterococcus faecalis* following various penicillin exposure regimens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:121-125.
 23. Herodolichian, T., L. Bongueferet, N. El-Solh, G. Blieth, and F. Deffbes. 1979. High-level plasmid-borne resistance to gentamicin in *Streptococcus faecalis* subsp. *zygogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16:686-689.
 24. Hyatt, J. M., P. S. McKinnon, G. S. Zimmer, and J. J. Schentag. 1995. The importance of pharmacokinetic/pharmacodynamic surrogate markers to outcome. Focus on antibacterial agents. *Clin. Pharmacokinet.* 28:143-160.
 25. Jones, R. L., H. A. Ludlum, and D. F. Brown. 1994. High dose ampicillin for the treatment of high-level aminoglycoside resistant enterococcal endocarditis. *J. Antimicrob. Chemother.* 33:891-892.
 26. Kathalia, S., V. Lofanis, R. Levandowski, and G. G. Jackson. 1984. Resistance to all aminoglycoside antibiotics in enterococcal endocarditis. *Clin. Res.* 32:372.
 27. Knapp, C., and J. A. Moody. 1992. Tests to assess bactericidal activity, p. 5.16.1-5.16.33. In H. D. Isenberg (ed.), *Clinical Microbiology procedures handbook*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 28. Libertin, C. R., and K. M. McKelvey. 1990. Gentamicin-resistant enterococcal endocarditis: the need for routine screening for high-level resistance to aminoglycosides. *South. Med. J.* 83:453-460.
 29. Lipman, M. L., and J. Silva, Jr. 1989. Endocarditis due to *Streptococcus faecalis* with high-level aminoglycoside resistant enterococcal endocarditis. *J. Antimicrob. Chemother.* 11:325-328.
 30. Malmardi, J. L., L. Gutmann, J. F. Acar, and F. W. Goldstein. 1995. Synergistic effect of amoxicillin and cefotaxime against *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1984-1987.
 31. Mizen, L., G. Woodruff, I. Kernutt, and E. Catherall. 1989. Simulation of human serum pharmacokinetics of ticarcillin-clavulanic acid and ceftazidime in rabbits and efficacy against experimental *Klebsiella pneumoniae* meningitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:693-699.
 32. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests on bacteria that grow aerobically, 4th ed. Approved standard M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
 33. Patel, I. H., J. G. Sugihara, R. E. Weinfeld, E. G. Wong, A. W. Siemsen, and S. J. Bernman. 1984. Ceftriaxone pharmacokinetics in patients with various degrees of renal impairment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:438-442.
 34. Patterson, J. E., S. M. Colodny, and M. J. Zervus. 1988. Serious infection due to β -lactamase-producing *Streptococcus faecalis* with high-level resistance to gentamicin. *J. Infect. Dis.* 158:1144-1145.
 35. Patterson, J. E., A. B. Sweeney, M. Shims, N. Carley, R. Mangi, J. Sabetta, and R. W. Lyons. 1990. An analysis of 110 serious enterococcal infections. Epidemiology, antibiotic susceptibility, and outcome. *Medicine (Baltimore)* 74:191-200.
 36. Pesterl, E., W. Graninger, and A. Georgopoulos. 1993. The efficacy of teicoplanin in the treatment of endocarditis caused by gram-positive bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 31:755-766.
 37. Rice, L. B., S. B. Calderwood, G. M. Eliopoulos, B. F. Farber, and A. W. Karchmer. 1991. Enterococcal endocarditis: a comparison of prosthetic and native valve disease. *Rev. Infect. Dis.* 13:1-7.
 38. Sacher, H. L., W. C. Miller, S. W. Landau, M. L. Sacher, W. A. Dixon, and K. A. Dietrich. 1991. Relapsing native-valve enterococcal endocarditis: a unique cure with oral dipiroxacin combination drug therapy. *J. Clin. Pharmacol.* 31:719-721.
 39. Sahn, D. F., and C. Torres. 1988. Effects of medium and inoculum variations on screening for high-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus faecalis*. *J. Clin. Microbiol.* 26:250-256.
 40. Thanvis, C., G. M. Eliopoulos, S. Willey, C. Wernervsten, and R. C. Moellering, Jr. 1987. Continuous-infusion ampicillin therapy of enterococcal endocarditis in rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31:139-143.
 41. Torres, C., C. Tenorio, J. Gavalda, M. Zarazaga, A. Puhissa, and F. Baquero. 1997. Ausencia de efecto sinérgico ampicilina-ceftriaxona en *Enterococcus faecalis*, abstr. 24, p. 104. In Program and abstracts of the 7th Reunión Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Madrid, Spain.
 42. van de Klundert, J. A. M., and J. S. Vliegenhart. 1993. PCR detection of genes coding for aminoglycoside-modifying enzymes, p. 547-552. In D. H. Persing, T. F. Smith, F. C. Tenover, and T. J. White (ed.), *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 43. van der Meer, J. T., W. van Vliet, E. Hu, W. B. van Leeuwen, H. A. Valkenburg, J. Thompson, and M. F. Michel. 1991. Distribution, antibiotic susceptibility and tolerance of bacterial isolates in culture-positive cases of endocarditis in The Netherlands. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10:728-734.
 44. Venditti, M., C. Brandimarte, M. Cassone, M. Gallè, A. Tarasi, and D. Tarasi. 1997. Endocarditis caused by an *Enterococcus faecalis* high-level resistant to aminoglycosides: failure of ampicillin and ceftriaxone combined therapy, abstr. 178, p. 178. In Program and abstracts of the Fourth International Symposium on Modern Concepts in Endocarditis and Cardiovascular Infections, Yverdon-Les-Bains, Switzerland.
 45. Wilson, W. R., A. W. Karchmer, A. S. Dajani, T. K. A. Aubert, A. Bayer, D. Kaye, A. L. Blum, P. Ferrieri, S. T. Shulman, and D. T. Durack. 1995. Antibiotic treatment of adults with infective endocarditis due to streptococci, enterococci, staphylococci, and HACEK microorganisms. *American Heart Association. JAMA* 274:1706-1713.

3. Estudio 2:

Efficacy of Teicoplanin-Gentamicin Given Once a Day on the Basis of Pharmacokinetics in Humans for Treatment of Enterococcal Experimental Endocarditis.

Pedro López, Joan Gavalrà, M. Teresa Martín, Benito Almirante, Xavier Gomis, Carlos Azuaje, Nuria Borrell, Leonor Pou, Vicenç Falcó, Carles Pigrau y Albert Pahissa.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2001. Vol., 45: p. 1387–1393.

3.1. Objetivos concretos del Estudio 2

1. Desarrollar un modelo matemático basado en un patrón farmacocinético bicompartimental abierto, que permita determinar cuáles son las dosis a infundir al animal de experimentación mediante un sistema de bombas controladas por ordenador, para simular los perfiles farmacocinéticos de teicoplanina y de gentamicina ambas administradas en una única dosis a humanos. Para ello, se evaluaron los parámetros farmacocinéticos de estos dos antibióticos en conejos sanos, y tras esto se administró la teicoplanina a los animales de una forma en la que se reprodujera en el suero del animal el perfil sérico que se consigue en humanos tras una administración de 10 mg/kg de teicoplanina y de 4,5 mg/kg/24 h de gentamicina.
2. Evaluar la eficacia terapéutica de la combinación de teicoplanina y gentamicina, administrada a los animales en una dosis única diaria, simulando los perfiles farmacocinéticos que presentan en los humanos ambos antibióticos, para el tratamiento de la endocarditis experimental causada por *E. faecalis*.

Efficacy of Teicoplanin-Gentamicin Given Once a Day on the Basis of Pharmacokinetics in Humans for Treatment of Enterococcal Experimental Endocarditis

PEDRO LÓPEZ,¹ JOAN GAVALDÀ,^{1*} M. TERESA MARTÍN,¹ BENITO ALMIRANTE,¹ XAVIER GOMIS,¹
 CARLOS AZUAJE,¹ NURIA BORRELL,¹ LEONOR POU,² VICENÇ FALCÓ,¹
 CARLES PIGRAU,¹ AND ALBERT PAHISSA¹

Infectious Diseases Research Laboratory, Infectious Diseases Division,¹ and Biochemistry Laboratory, Hospital General Vall d'Hebron,² Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Received 17 July 2000/Returned for modification 12 November 2000/Accepted 8 February 2001

With the aim of investigating home therapy for enterococcal endocarditis, we compared the efficacy of teicoplanin combined with gentamicin given once a day or in three daily doses (t.i.d.) with the standard treatment, ampicillin plus gentamicin administered t.i.d., for treating experimental enterococcal endocarditis. The antibiotics were administered by using "human-like pharmacokinetics" (H-L), i.e., pharmacokinetics like those in humans, that simulated the profiles of these drugs in human serum. Animals with catheter-induced endocarditis were infected intravenously with 10^8 CFU of *Enterococcus faecalis* EF91 (MICs and MBCs of ampicillin, gentamicin, and teicoplanin, 0.5 and 32, 16 and 32, and 0.5 and 1 $\mu\text{g/ml}$, respectively) and were treated for 3 days with ampicillin H-L at 2 g every 4 h plus gentamicin H-L at 1 mg/kg every 8 h, or teicoplanin H-L at 10 mg/kg every 24 h, alone or combined with gentamicin, administered at dose of H-L at 1 mg/kg every 8 h or H-L at 4.5 mg/kg every 24 h. The results of therapy for experimental endocarditis due to EF91 showed that teicoplanin alone was as effective as ampicillin alone in reducing the bacterial load ($P > 0.05$). The combination of ampicillin or teicoplanin with gentamicin was more effective than the administration of both drugs alone in reducing the \log_{10} CFU/gram of aortic vegetation ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively). Teicoplanin plus gentamicin H-L at 4.5 mg/kg, both administered every 24 h, showed an efficacy equal to the "gold standard," ampicillin plus gentamicin H-L at 1 mg/kg t.i.d. ($P > 0.05$). Increasing the interval of administration of gentamicin to a single daily dose combined with teicoplanin resulted in a reduction of bacteria in the vegetations equivalent to that achieved with the recommended regimen of ampicillin plus thrice-daily gentamicin in the treatment of experimental endocarditis due to *E. faecalis*. Teicoplanin plus gentamicin, both administered once a day, may be useful home therapy for selected cases of enterococcal endocarditis.

The combination of penicillin or ampicillin and an aminoglycoside during 4 to 6 weeks is the recommended therapy for enterococcal endocarditis (2). The daily dose of aminoglycoside has generally been administered to patients in three, or occasionally, two divided doses. However, to avoid the potential toxic effects of prolonged aminoglycoside therapy, new treatment regimens, such as increasing the dosing interval of aminoglycoside administration, have been studied. Moreover, pharmacodynamic data obtained from the animal model (22, 23, 39) have shown that the aminoglycoside exhibit concentration-dependent killing, supporting the idea that once-a-day administration might be more efficacious. Along this line, the efficacy of gentamicin given once a day has been shown to be effective for the treatment of experimental endocarditis due to viridans streptococci (3, 16, 34) and due to *Staphylococcus aureus* (J. Gavalda, M. Laguarda, J. A. Capdevila, L. Pou, E. Crespo, and A. Pahissa, Abstr. 35th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. B44, 1995). However, the efficacy of once-a-day gentamicin in the treatment of experimental endocarditis due to *Enterococcus faecalis* remains controversial (11, 17, 21, 26, 36).

The possibility of home therapy for endocarditis due to viridans streptococci using a combination of ceftriaxone plus an aminoglycoside, both administered once a day, has been evaluated in animal models of endocarditis (3; C. W. Dorschner, B. M. Tallan, M. S. Rouse, J. M. Steckelberg, H. C. Chambers, and W. R. Wilson, 30th ICAAC, abstr. 700, 1990; H. F. Chambers, S. Kennedy, M. Fournier, M. Rouse, and W. Wilson, 30th ICAAC, abstr. 701, 1990) and in humans (14). This therapeutic approach was also demonstrated to be effective in experimental studies of endocarditis due to *Staphylococcus aureus* (Gavalda et al., 35th ICAAC).

The glycopeptides vancomycin and teicoplanin may be useful alternatives to penicillin for treating enterococcal endocarditis in cases of resistance, allergy to penicillins, or for outside-hospital treatment. Teicoplanin has an antibacterial spectrum similar to that of vancomycin, and it has a longer elimination half-life, which allows once-a-day intravenous (i.v.) or intramuscular administration. These features offer the chance for home treatment in selected cases of infective endocarditis.

The aim of the present study was to evaluate the efficacy of teicoplanin combined with gentamicin, both given once a day, in the treatment of experimental endocarditis due to *E. faecalis*. The antibiotics were administered to the test animals by means of a pharmacokinetic model that mimicked the human serum profile of the drugs.

(This work was presented in part at the 37th Interscience

* Corresponding author. Mailing address: Servei de Malalties Infeccioses, Hospital General Vall d'Hebron, Hospitals Vall d'Hebron, Avda. Vall d'Hebron, 119-129, 08035 Barcelona, Spain. Phone: 34-93-4894033. Fax: 34-93-2746057. E-mail: gavalda@hg.vhebron.es.

Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Toronto, Ontario, Canada, September 28 to October 1, 1997 [abstr. B-22].

MATERIALS AND METHODS

Strains, media, and antimicrobials. We studied seven *E. faecalis* strains susceptible to ampicillin, teicoplanin, and aminoglycosides, originally isolated from patients with endocarditis, and *E. faecalis* ATCC 29212 as reference test strain. All the strains were identified by the API 20 STREP system (bioMérieux, La Balme Les Grottes, France) and confirmed according to the criteria recommended by Facklam and Collins (10). The in vivo studies were performed with *E. faecalis* EP91. Working stock cultures were kept frozen at -70°C in double-strength skim milk (Difco Laboratories, Detroit, Mich.). Before each experiment, one aliquot was thawed and subcultured onto 5% sheep blood Columbia agar plates (bioMérieux).

Mueller-Hinton broth (MHB; Difco Laboratories), 5% sheep blood Mueller-Hinton agar plates, and 5% sheep blood Columbia agar plates (BCA; bioMérieux) were used. The antibiotics studied were ampicillin (Aantibiotics S.A., Madrid, Spain), teicoplanin (Aventis S.A., Madrid, Spain), and gentamicin (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). Ampicillin and teicoplanin solutions were prepared fresh on the day used. Stock solutions of gentamicin were prepared and stored at -70°C .

In vitro studies. MICs were determined on cation-adjusted MHB by the standard microdilution method following the guidelines of the NCCLS (30). The MBC was determined after 48 h of incubation of 0.025 ml from the control well, from the first well containing growth, and from all the wells without visible growth plated onto 5% BCA plates for colony count. The MBC was defined as the lowest concentration of antibiotic that killed 99.9% of the original inoculum (1).

To perform time-kill synergy studies, we followed the method described by Sahn and Torres (34). Prior to inoculation, each tube of fresh, prewarmed MHB was supplemented with gentamicin (final concentrations, 1, 3, and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) either alone or in combination with teicoplanin (final concentrations, 0.5 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). A positive growth tube without antibiotics was used as a control. Test tubes were inoculated with 10^7 CFU of *E. faecalis*/ml in the logarithmic phase of growth, incubated at 37°C in room air, and the \log_{10} of the number of CFU/ml after 24 h was determined after 0, 4, and 24 h of incubation. Synergy was defined as a $\geq 2 \log_{10}$ decrease in the CFU/ml after 24 h, and the number of surviving organisms in the presence of the combination had to be $\geq 2 \log_{10}$ CFU/ml below the starting inoculum. The combination was considered to have bactericidal activity when a $\geq 3\text{-log}_{10}$ reduction in colony counts was reached.

Animals. New Zealand White rabbits (body weight, 2 kg) were obtained from BK Universal (Barcelona, Spain). The animals were housed in the animal facility of our hospital, which is equipped with automatic air exchange with a HEPA filter and a circadian light cycle. The animals were acclimated ad libitum with sterile water and feed.

Pharmacokinetics. Ampicillin, teicoplanin, and gentamicin were administered using a system to reproduce the human serum pharmacokinetics in rabbits and mimic the human serum profile after an i.v. infusion of ampicillin (2 g/4 h), teicoplanin (10 mg/kg/24 h), gentamicin (1 mg/kg/8 h), or gentamicin (4.5 mg/kg/24 h). We employed a computer-controlled infusion pump system that delivered decreasing quantities of drug (Alice King). The computer software was written by our group. With this program the flow rate of the pump can be changed automatically, and flow rate sequences can be repeated as often as required. This approach involved three steps: (i) estimation of ampicillin, teicoplanin, and gentamicin pharmacokinetic parameters in the rabbit; (ii) application of a mathematical model to obtain the required infusion doses to simulate human kinetics in the animal; and (iii) in vivo experimental pharmacokinetic studies. These studies were done to simulate in rabbits the pharmacokinetic profile of ampicillin, teicoplanin, and gentamicin in humans.

The pharmacokinetic studies which led to the human-like pharmacokinetics of ampicillin in rabbits, including the explanation of the mathematical model to use on the basis of an open one-compartment model, have been described previously (17). The pharmacokinetic data of the human-adapted model of 2 g of ampicillin given i.v. in rabbits are shown in Table 1 and Fig. 1A. The serum profile and the pharmacokinetic parameters of ampicillin in rabbits administered antibiotics with this model were similar to those of 2 g of i.v. ampicillin in humans (17).

(i) **Estimation of teicoplanin and gentamicin pharmacokinetic parameters in rabbits.** To determine the concentrations of teicoplanin in serum, blood was drawn from a carotid catheter at 4, 8, 10, 15, 20, 30, and 60 min and at 2, 4, and 6 h after a single i.v. injection of a 20-mg/kg dose of teicoplanin. This study was

TABLE 1. Comparison of the pharmacokinetic parameters of the antimicrobials used in the in vivo studies^a

Antimicrobial (dose) and subject	k_{el} (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	AUC _{0-∞} ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$)
Teicoplanin (10 mg/kg)			
Rabbit ^b	0.7 ± 0.02	4.12 ± 0.6	296.3
Human ^c	0.068	10.1	731.7
Rabbit "human-like" ^d	0.061 ± 0.002	11.3 ± 0.4	765.3 ± 35.1
Gentamicin (1 mg/kg)			
Rabbit ^b	0.64 ± 0.22	1.09 ± 0.3	9.6
Human ^c	0.27	2.54	18
Rabbit "human-like" ^d	0.27 ± 0.034	2.5 ± 0.37	15.80 ± 1.24
Gentamicin (4.5 mg/kg)			
Rabbit ^b	0.64 ± 0.22	1.09 ± 0.3	24.05
Human ^c	0.25	2.8	66.2
Rabbit "human-like" ^d	0.24 ± 0.014	2.9 ± 0.18	76.84 ± 17.7
Ampicillin (2 g)			
Rabbit ^b	2.4 ± 0.29	0.3 ± 0.03	38.19
Human ^c	0.63	1.1	127.8
Rabbit "human-like" ^d	0.71 ± 0.05	0.99 ± 0.08	116.7 ± 31.83

^a The pharmacokinetic parameters were estimated on the basis of an open one-compartment model.

^b $t_{1/2}$ and k_{el} data are for healthy rabbits treated i.v. with a 20-mg/kg dose of teicoplanin, a 6-mg/kg dose of gentamicin, and a 100-mg/kg dose of ampicillin given i.v. The AUC_{0-∞} was calculated from the data of an ideal profile obtained with a C_0 of 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for teicoplanin and 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for ampicillin, a C at 0.5 h of 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for gentamicin at 1 mg/kg, a C at 0.5 h of 18 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for gentamicin at 4.5 mg/kg, and the k_{el} of teicoplanin, ampicillin, and gentamicin in the rabbit.

^c k_{el} , $t_{1/2}$, and AUC_{0-∞} values were obtained from an ideal human serum profile of 10 mg of teicoplanin per kg, 2 g of ampicillin, and 1 or 4.5 mg of gentamicin per kg.

^d Data are for H-L of 10 mg of teicoplanin per kg, 2 g of ampicillin, and 1 or 4.5 mg of gentamicin per kg.

done in four healthy rabbits. Teicoplanin concentrations were determined by an immunoassay method (TDx; Abbott Diagnostics, Irving, Tex.). The sensitivity of the assay was 1.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of sample, and the between- and within-day coefficients of variation for replicates ($n = 7$) at 4 and 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ were $<5\%$.

To determine concentrations of gentamicin in serum, blood was drawn from a carotid catheter at 4, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, and 90 min and at 2, 2.5, 3, 3.5, and 4 h after a single i.v. injection of a 6-mg/kg dose of gentamicin. This study was done in seven healthy rabbits. Gentamicin concentrations were determined by an immunoassay method (Abbott). The sensitivity of the assay was 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of sample, and the between- and within-day coefficients of variation for replicates ($n = 7$) were $<4.6\%$ and 2.5% , respectively.

The serum disposition constants (α , β), the zero-time intercept for the α phase ($A\alpha$) and the zero-time intercept for the β phase ($B\beta$) of teicoplanin and gentamicin in the rabbit were determined by using a nonlinear least-squares regression analysis of the concentration-in-serum-versus-time curve on the basis of an open two-compartment model.

(ii) **Application of a mathematical model to obtain the required infusion doses to simulate the human kinetics of teicoplanin and gentamicin in both dosages as drugs with an open two-compartment model.** The mathematical model dealing with the administration of drugs with human-like pharmacokinetics on the basis of an open two-compartment model has been previously published (18).

(iii) **In vivo experimental pharmacokinetic studies.** In vivo pharmacokinetic studies were done to simulate in rabbits the pharmacokinetic profile of a 10-mg/kg dose of teicoplanin or gentamicin given at 1 mg/kg/8 h and 4.5 mg/kg/24 h in humans. The doses of teicoplanin and gentamicin administered in three daily doses (t.i.d.) are those recommended for the treatment of endocarditis. Briefly, two polyethylene catheters (inner diameter, 0.81 mm; outer diameter, 1.27 mm; Portex SA; Hythe, Kent, England) were inserted, one through the carotid artery (sampling) and the other into the cava vein through the jugular vein (infusion), as previously described (17, 18). The pump system was set up to deliver previously calculated flow rates of i.v. infusion to simulate the human kinetics of teicoplanin or gentamicin administered t.i.d. or once daily. This study was done in four healthy rabbits for teicoplanin and in nine healthy rabbits each for gentamicin at doses of 1 mg/kg/8 h and 4.5 mg/kg/24 h. To determine serum teicoplanin levels, 2 ml of blood was sampled through the carotid catheter at 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, and 24 h after the start of infusion. Teicoplanin

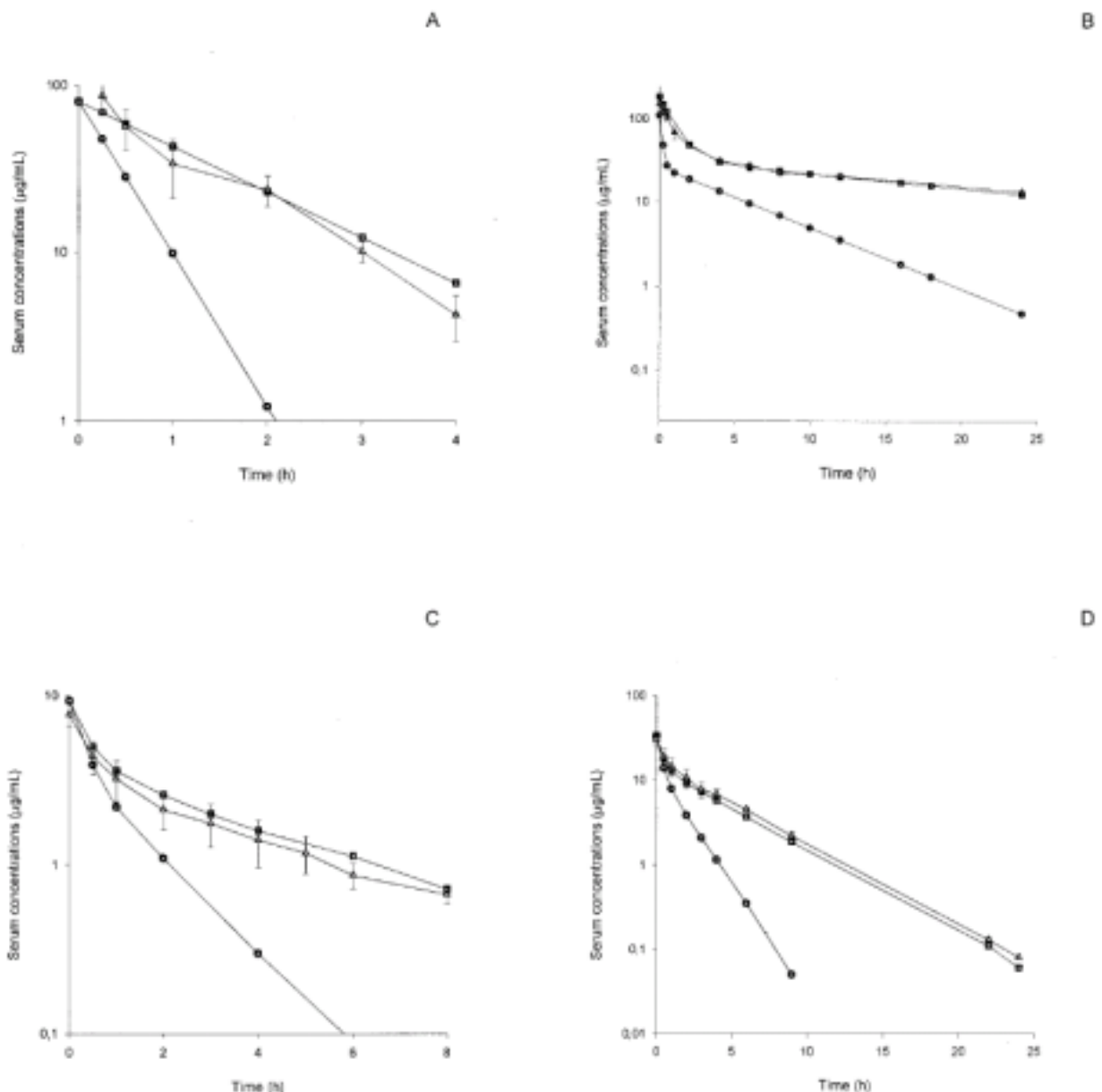


FIG. 1. Results of the pharmacokinetic studies in rabbits using H-L of 2 g of ampicillin (A), teicoplanin at 10 mg/kg (B), gentamicin at 1 mg/kg (C), and gentamicin at 4.5 mg/kg (D). Symbols: ○, rabbit ideal; □, human; △, rabbit "human-like."

concentrations in serum were assayed using the immunoassay described above. To estimate gentamicin human-like pharmacokinetics, 2 ml of blood was sampled at 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, and 6 h after the start of infusion in the rabbits mimicking the human profile of 1 mg/kg/8 h and at 0, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 9, 22, and 24 h in the animals mimicking the human profile of 4.5 mg/kg/24 h. Concentrations in serum were assayed as mentioned above. Different pharmacokinetic parameters were estimated on the basis of an open one-compartment model to compare the pharmacokinetics of teicoplanin and gentamicin in rabbits, in the human-adapted model, and in humans. The half-lives at the β phase of teicoplanin and gentamicin in the rabbits with human-like pharmacokinetics ($t_{1/2}$) were calculated as the $\ln 2/k_d$, where k_d is the elimination rate constant. The elimination rate constant was determined as the slope obtained from a linear regression analysis of the terminal phase of the plasma-concentration-versus-time curve on the basis of an open one-compartment model. Thereafter, the $AUC_{0-\infty}$ was calculated as C_0/k_d , the pharmacokinetic parameters of

teicoplanin in humans and rabbits were calculated as described above with a C_0 of 150 µg/ml; the pharmacokinetic parameters of gentamicin administered at dose of 1 mg/kg/8 h in humans and rabbits were calculated as described above with a $C_{0.5}$ of 5 µg/ml, and the pharmacokinetic parameters of gentamicin administered at dose of 4.5 mg/kg/24 h were calculated as described above with a $C_{0.5}$ of 18 µg/ml.

Establishing endocarditis and installing the infusion pump system. Experimental aortic valve infective endocarditis was induced in New Zealand White rabbits (weight, ca. 2 to 2.1 kg) by the method of Garrison and Freedman (15), modified as described by Durack et al. and Perlman and Freedman (6-9, 31, 32). The induction of non-bacterial thrombotic endocarditis was done as previously described (16, 17). Briefly, a polyethylene catheter was inserted through the right carotid artery into the left ventricular cavity and was left in place throughout the experiment. The same day, one or two catheters (inner diameter, 0.81 mm; outer diameter, 1.27 mm; Portex SA), depending on the treatment group, were placed

into the inferior vena cava through the jugular vein by the same technique described previously (18) to administer the ampicillin, teicoplanin, and gentamicin treatment. The infusion pump system was set up to deliver 2 ml of 0.9% saline per h to keep the catheter open until the beginning of antimicrobial administration. At 24 h after placement of the intracardiac catheter, different groups of animals were inoculated via the jugular catheter with 1 ml of saline containing 10^8 CFU of the *E. faecalis* EP91 strain in a stationary phase of growth. A 1-ml amount of blood was obtained 48 h after infection and just before initiation of antimicrobial therapy in order to confirm the presence of endocarditis. The blood specimen was mixed with 20 ml of molten Trypticase soy agar. Plates were incubated for 48 h at 35°C in room air, and the presence of enterococci was interpreted as indicative of infective endocarditis.

Treatment groups and estimation of therapeutic efficacy. Antimicrobial therapy was initiated 48 h after infection and was continued for 3 days. The infected rabbits were randomized into the following treatment groups: control without treatment; ampicillin 'human-like pharmacokinetics' (H-L) at 2 g/4h i.v.; ampicillin H-L at 2 g/4 h i.v. plus gentamicin H-L at 1 mg/kg/8 h i.v.; teicoplanin H-L at 10 mg/kg/24 h i.v.; teicoplanin H-L at 10 mg/kg/24 h i.v. plus gentamicin H-L at 1 mg/kg/8 h i.v.; and teicoplanin H-L at 10 mg/kg/24 h i.v. plus gentamicin H-L at 4.5 mg/kg/24 h i.v.

After 3 days of treatment, the surviving animals were sacrificed 6 h after ending the infusion of antibiotics with a lethal i.v. injection of sodium pentothal. The chest was opened, the heart was excised and opened, and the aortic valve vegetations were removed aseptically. Only those animals with proper placement of the catheter, macroscopic evidence of vegetations at the time of sacrifice, and enterococci on cultures of blood obtained before the start of antimicrobial therapy were included in the study. The animals included in the control group were sacrificed 48 h after the induction of infection. The vegetations were rinsed with saline, weighed, and homogenized in 2 ml of Trypticase soy broth (Difco Laboratories) in a tissue homogenizer (Stomacher 80). Homogenates were quantitatively cultured onto 5% BCA plates. The plates were incubated for 48 h at 37°C in room air. In order to surmount the carryover effect, the vegetations of the animals treated with ampicillin or teicoplanin combined with gentamicin were washed by centrifugation of the homogenates at $2,500 \times g$ for 10 min. The supernatant was removed, and the bacterial pellet was resuspended in drug-free medium. We used two washings to ensure extensive drug removal. The homogenates of the vegetations from animals treated with ampicillin or teicoplanin alone were not washed because we needed a 10^{-2} dilution in order to obtain a culture that could be counted. Results were expressed as the \log_{10} CFU of *E. faecalis* EP91 per gram of vegetation. Bacterial densities in valvular vegetations, calculated to be between 0 and 2 log CFU/g, were reported as \log_{10} 2 CFU/g rather than 0 because of potential errors associated with the low weight of the valvular tissue.

Analysis of results. Results were expressed as the mean and the 95% confidence interval of the mean of the \log_{10} CFU of *E. faecalis* per gram of vegetation. Differences in \log_{10} CFU of enterococci per gram of vegetation were compared using one-way analysis of variance. When the *F* value was significant, each treatment group was compared with the control group and with each of the other treatment groups using Scheffe's test. *P* values of ≤ 0.05 were considered significant.

RESULTS

In vitro studies. The MIC and MBC of ampicillin, gentamicin, and teicoplanin for strain EF91 were 0.5 and 32, 16 and 32, and 0.5 and 1 μ g/ml, respectively. The ranges of MICs and MBCs for ampicillin, gentamicin, and teicoplanin of the other strains were 0.5 to 1 and 8 to 32, 8 to 16 and 16 to 64, and 0.25 to 0.5 and 1 to 4 μ g/ml, respectively. All strains were susceptible to ampicillin and teicoplanin, and no strains showed high-level resistance to gentamicin.

The results of the time-kill studies are shown in Table 2. Teicoplanin or gentamicin alone, at the concentrations tested, were only bacteriostatic (the viable counts of the culture did not decrease $\geq 3 \log_{10}$ after 24 h of incubation). In contrast, the combinations of teicoplanin at 10 μ g/ml and gentamicin at 1, 3, or 10 μ g/ml showed a bactericidal effect. In four of seven strains the combination of teicoplanin at 0.5 μ g/ml plus gentamicin lost this effect. After 24 h of incubation, synergy was

TABLE 2. Results of time-kill experiments at 24 h with seven *E. faecalis* strains

Antimicrobial agent(s) ^b (dose [μ g/ml])	<i>E. faecalis</i> count (change in \log_{10} CFU/ml) ^a						
	EF6	EF37	EF42	29212	EF105	EF69	EP91
Growth control	+1.97	+2.14	+2.26	+2.26	+1.72	+2.49	+1.91
T (0.5)	-0.47	+1.37	-1.32	-0.19	-0.3	+2.33	+0.67
T (10)	-1.06	+0.5	-2.1	+0.14	-0.2	-0.19	-0.71
G (1)	+1.68	+2.02	+2	+1.79	+1.77	+1.6	+1.64
G (3)	+1.39	+1.8	+1.88	+0.41	+1.04	+2.09	+1.45
G (10)	+0.18	+0.1	+0.1	-1.25	+0.18	-1.43	+0.78
T (0.5) + G (1)	-3.05	-3.1	-3.2	-2.9	-1.75	+2.2	-4.19
T (0.5) + G (3)	-3.14	-3.3	-3.3	-3.01	-2.93	+2.0	-4.82
T (0.5) + G (10)	-3.19	-4.1	-3.89	-3.55	-3.22	-0.84	-4.82
T (10) + G (1)	-3.2	-4.2	-4.15	-3.23	-3	-4.27	-3.87
T (10) + G (3)	-3.35	-4.98	-4.61	-4.22	-3.08	-4.38	-4.52
T (10) + G (10)	-3.68	-5.37	-5.21	-5.25	-3.06	-4.7	-4.82

^a Results are given as the change of \log_{10} CFU/ml with respect to the initial inoculum.

^b T, teicoplanin; G, gentamicin.

present between teicoplanin plus gentamicin in all seven strains of *E. faecalis*. Figure 2 shows the time-kill curve of the strain used in the in vivo studies. The results of the combinations of teicoplanin at 10 μ g/ml and gentamicin at 1, 3, or 10 μ g/ml did not differ substantially from those shown in Fig. 2 for the combinations of teicoplanin at 0.5 μ g/ml plus gentamicin at the different concentrations.

Pharmacokinetic studies. The rabbit pharmacokinetic data of teicoplanin, determined in four healthy rabbits that had received one i.v. bolus dose of 20 mg/kg were as follows (mean \pm standard deviation): α_T , $7.85 \pm 3.57 \text{ h}^{-1}$; β_T , $0.1712 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$; k_{21T} , $1.093 \pm 0.52 \text{ h}^{-1}$; k_{12T} , $1.35 \pm 0.54 \text{ h}^{-1}$; and *V_r*, 0.33 ± 0.14 liters/kg. The concentration profile in human serum produced by a 10-mg/kg i.v. injection of teicoplanin was successfully simulated in rabbits using the controlled-infusion pump system (Fig. 1B). The pharmacokinetic parameters obtained from the human-adapted model were similar to those of the 10-mg/kg i.v. dose teicoplanin in humans (Table 1).

The pharmacokinetic data of the 6-mg/kg dose of gentamicin given i.v. in nine healthy rabbits were as follows: α_T , $2.96 \pm 0.86 \text{ h}^{-1}$; β_T , $0.6 \pm 0.13 \text{ h}^{-1}$; k_{21T} , $1.49 \pm 0.23 \text{ h}^{-1}$; k_{12T} , $1.14 \pm 0.12 \text{ h}^{-1}$; and *V_r*, 0.2 ± 0.05 liters/kg. The results of the human-adapted model in rabbits, reproducing the pharmacokinetic parameters of the i.v. administration of 1- and 4.5-mg/kg doses of gentamicin in humans, are shown in Table 1 and Fig. 1C and the i.v. D.

Treatment of established endocarditis. Results of therapy for experimental endocarditis caused by *E. faecalis* EP91 are shown in Table 3. After 3 days of treatment, the bacterial counts were reduced in the vegetations of the treated animals compared to the control group with all the drug regimens (*P* < 0.001). Comparisons between the treated groups revealed that teicoplanin alone was as effective as ampicillin alone (*P* > 0.05). The combinations of gentamicin plus ampicillin or teicoplanin were significantly more effective than ampicillin alone in reducing the number of bacteria in the vegetations (*P* < 0.01). Teicoplanin plus gentamicin given once or daily t.i.d. were more efficacious than teicoplanin given alone (*P* < 0.01).

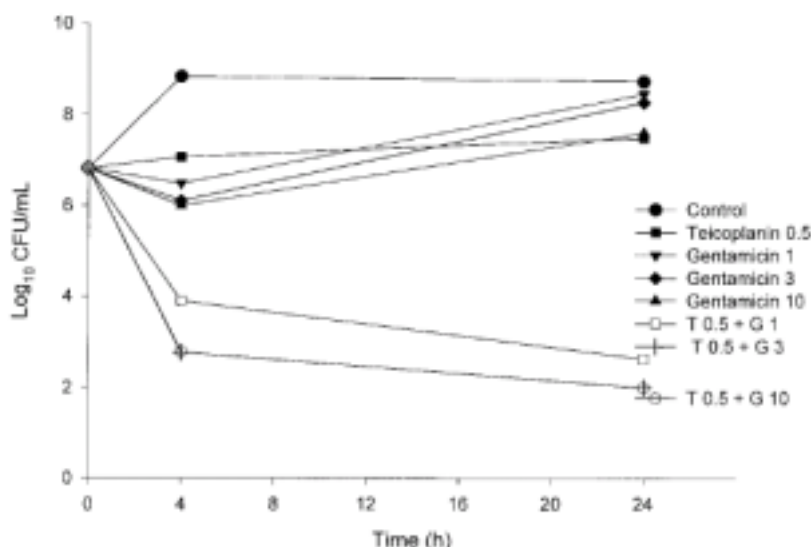


FIG. 2. Time-kill curve of teicoplanin (T) at 0.5 $\mu\text{g/ml}$ and of gentamicin (G) at 1, 3, and 10 $\mu\text{g/ml}$ for *E. faecalis* EF91.

Teicoplanin plus gentamicin H-L at 4.5 mg/kg, both administered once a day, was effective and displayed an activity similar to the gold standard, ampicillin plus gentamicin H-L at 1 mg/kg t.i.d. ($P > 0.05$).

DISCUSSION

The purpose of this study was to evaluate the efficacy of teicoplanin plus gentamicin, both given once a day and administered as H-L, for the treatment of experimental enterococcal endocarditis. Our results show that a single daily dose of gentamicin combined with teicoplanin was as effective as the recommended treatment for *E. faecalis* endocarditis in humans, which consists of ampicillin plus gentamicin at a dose of 1 mg/kg every 8 h.

Munckhof et al. (29) conducted a meta-analysis that evaluated all the randomized clinical studies dealing with once-a-day administration of aminoglycosides. They found that aminoglycosides can be given once daily, rather than in divided doses, for treating human infections other than endocarditis without loss of efficacy or increased toxicity, offering greater simplicity and potentially improved cost-effectiveness.

The advantage of once-daily administration of aminoglycosides for the treatment of endocarditis is presently under discussion (3, 5, 11, 16, 17, 35; Dorschner et al., 30th ICAAC). The combinations of aminoglycosides administered once-a-day with penicillin or ceftriaxone have been found to be effective in studies using penicillin-susceptible (3, 13, 16, 35), -tolerant (16), -resistant (16), and nutritionally variant (16) viridans streptococcal or staphylococcal (Gavaldà et al., 35th ICAAC) endocarditis models. Based on these results, a successful clinical trial was conducted using the combination of ceftriaxone plus netilmicin, both administered once-a-day during 2 weeks to treat patients with streptococcal endocarditis (14).

The use of combination regimes with aminoglycosides administered once daily for the treatment of enterococcal endocarditis is still controversial (11, 17, 21, 26, 36). Our data suggest that increasing the dosage interval of aminoglycosides

to once a day has no influence on the in vivo efficacy of the combination of teicoplanin and gentamicin for the treatment of enterococcal experimental endocarditis, and these data are also consistent with our previous results using a combination of ampicillin and gentamicin once a day for treatment of this disease in rabbits (17). Recently, Schwank and Blaser (36) studied once-daily versus t.i.d. netilmicin combined with amoxicillin, penicillin, or vancomycin against *E. faecalis* in an in vitro model by using H-L. These authors concluded that under their experimental conditions it could not be confirmed that once-daily dosing of aminoglycosides is contraindicated for treating infections caused by *E. faecalis*. Moreover, Houlihan et al. (21) compared the pharmacodynamic activities of vancomycin and ampicillin alone or combined with gentamicin given once daily or t.i.d. in an in vitro model of fibrin-platelet clots infected with *E. faecalis*. They found no significant differences in bacterial reductions between the combination regimes of aminoglycosides administered once or thrice daily by using H-L. In con-

TABLE 3. Treatment of experimental endocarditis caused by *E. faecalis* EF91 with a human-like profile with ampicillin or teicoplanin alone or in combination with gentamicin given once or three times a day

Treatment group	No. of animals that died/total no.	Mean log CFU of vegetation/ g^a (95% CI)
Control	4/24	9.55 (9.23-9.87)
Ampicillin ^b	3/15	7.25 (6.50-7.99)*
Ampicillin plus gentamicin, tid ^b	2/15	5.23 (4.39-6.07)**
Teicoplanin ^b	3/18	6.66 (6.15-7.16)*
Teicoplanin plus gentamicin, tid ^b	2/14	4.86 (4.09-5.63)**
Teicoplanin plus gentamicin, once daily ^b	2/14	5.07 (4.22-5.92)**

^a Results show the mean log CFU of aortic vegetations per gram after 3 days of treatment. The 95% confidence interval (95% CI) is indicated in parentheses.

*, $P < 0.001$ versus control; †, $P < 0.01$ versus ampicillin; ‡, $P < 0.05$ versus teicoplanin.

^b Ampicillin at 2 g/4 h given i.v. (H-L); teicoplanin at 10 mg/kg i.v. (H-L); gentamicin at 1 mg/kg/8 h i.v. (H-L) (gentamicin, t.i.d.); gentamicin at 4.5 mg/kg/24 h i.v. (H-L) (gentamicin, once daily).

trast to these findings and the present and previous (17) results from our group, Fantin and Carbon (11) and Marangos et al. (26) reported that penicillin plus aminoglycoside (netilmicin or gentamicin) given t.i.d. was more effective than penicillin plus the same total daily dose of the aminoglycoside given daily in the treatment of enterococcal experimental endocarditis.

The most probable explanation for the discrepancies between our results and those of Fantin and Carbon (11) and Marangos et al. (26) is that the experimental variables in the two studies are distinct, a fact that makes comparison difficult. First, the β -lactams used (penicillin versus ampicillin), although similar, may possess different activities against *E. faecalis* (28). Second, our experimental kinetic model simulated the human kinetics of ampicillin after a 2-g i.v. dose every 4 h. A relationship has been shown between the shape of the β -lactam AUCs and their antimicrobial activities (19, 20), this factor may also affect their *in vivo* efficacy when combined with aminoglycosides. Finally, the doses of aminoglycosides administered t.i.d., in the studies of Fantin and Carbon (11) and Marangos et al. (26) were higher than those used in our studies, which used levels similar to those recommended for the treatment of enterococcal endocarditis in humans (doses that produce peak serum concentrations of 3 to 5 $\mu\text{g/ml}$) (2). This may explain the slightly increased efficacy (ca. 0.5 \log_{10} CFU/g of vegetation) these authors found with the use of the combinations with aminoglycosides administered t.i.d. If they had used aminoglycoside doses t.i.d., resulting in lower peak concentrations in serum (3 to 5 $\mu\text{g/ml}$), they might have found an activity similar to the regime of the β -lactam plus the same total dose of aminoglycoside once-a-day. In our opinion, there is no definitive data to date that preclude the use of once-daily administration of aminoglycosides for treating enterococcal infections.

The glycopeptide teicoplanin could be an alternative to a β -lactam for treating enterococcal endocarditis. Teicoplanin has an antibacterial spectrum similar to that of vancomycin and a longer elimination half-life, which allows once-a-day administration by the i.v. or intramuscular route (12). The results of studies with animal models evaluating teicoplanin therapy for enterococcal endocarditis are in accordance with our present study. Sullam et al. (37) reported that teicoplanin was as effective as ampicillin for treating experimental endocarditis due to *E. faecalis*. Our results, with use of a human-like kinetic model, are similar to those found in the late 1980s by Sullam et al. In that study teicoplanin alone showed a trend toward higher efficacy compared to ampicillin, though the difference did not reach statistical significance (7.25 versus 6.66 mean \log CFU/g of vegetation; $P > 0.05$). Likewise, an association with gentamicin given t.i.d. increased the efficacy of teicoplanin alone (6.66 versus 5.07 mean \log CFU/g of vegetation; $P < 0.05$). In the study of Chambers and Kennedy (5), the significance of different pharmacokinetic parameters in the efficacy of teicoplanin was examined in experimental endocarditis. The efficacy of teicoplanin was found to be superior when the drug was administered by the intramuscular rather than the i.v. route, despite the fact that higher peak concentrations in serum were achieved with the i.v. administration. Interestingly, the trough concentration of teicoplanin was higher when it was given intramuscularly (34 ± 10 versus 26 ± 11 $\mu\text{g/ml}$). These authors concluded that a sustained concentration of teicoplanin in serum several times above the MIC may be important

for efficacy *in vivo*, and they recommended that the trough concentration should be at least 10 times above the MIC of the infecting microorganism. In our study, the administration of the drugs by a computer-controlled pump system provided a teicoplanin trough concentration in serum at 24 h of 21.6 ± 2.9 $\mu\text{g/ml}$. This concentration exceeds by ca. 20-fold the MBC of teicoplanin for the EF91 strain used in the *in vivo* experiments (1 $\mu\text{g/ml}$), and this fact could account for the good outcome of our experiments with the administration of teicoplanin alone or combined with gentamicin.

A small number of patients with *E. faecalis* endocarditis treated with teicoplanin alone have been described in the literature (25, 24, 27, 33, 40). Lepout et al. (24) reported one case of enterococcal endocarditis treated successfully with teicoplanin at a dosage of 10.6 mg/kg/day for 48 days. Martino et al. (27) treated four patients; three of them were cured, and one relapsed and was cured with surgery plus treatment with ampicillin and gentamicin. A 4-week course of 10 mg/kg/day has been found to be effective against native streptococcal endocarditis (38). Presterl et al. (33) treated and cured five patients. Lewis et al. (25) reported a retrospective European multicenter study including 115 patients with endocarditis due to gram-positive pathogens, evaluating the outcome: efficacy, and safety of using teicoplanin alone or in combination with other drugs. There were 22 cases of enterococcal endocarditis: 10 treated with monotherapy and 12 treated in combination with aminoglycosides. All of the patients treated with the combination were cured, whereas treatment was not successful in 2 of the 10 patients treated with monotherapy. Despite these promising findings, it seems reasonable to combine treatment with aminoglycosides if teicoplanin is used for the treatment of enterococcal endocarditis.

Home treatment would potentially be of benefit in endocarditis because therapy is prolonged, and the patients are frequently capable of self-care after the first 2 weeks of treatment. One important area of research interest is single daily-dose regimens that could allow home therapy for selected cases of endocarditis, with attendant cost savings. In studies of experimental streptococcal endocarditis, a single-daily dose of an aminoglycoside in combination with ceftriaxone was as effective as the elective treatment with penicillin plus aminoglycosides in divided doses (3, 13; Dorscher et al., 30th ICAAC). Teicoplanin plus gentamicin, both administered once a day, could be an alternative therapeutic approach for selected cases of enterococcal endocarditis on an outpatient basis, probably after 2 weeks of treatment in the hospital environment. Our experimental results showed that teicoplanin plus gentamicin, both administered once a day by means of a controlled infusion pump system to mimic human kinetics, was as effective as the elective treatment with ampicillin at 2 g/4 h plus gentamicin at 1 mg/kg/8 h. The results from a recent clinical study by Venditti et al. (38) provide evidence that a single daily dose of teicoplanin plus gentamicin could be a good therapeutic option for home treatment of selected cases of enterococcal endocarditis. Six patients with enterococcal endocarditis were cured when treated with teicoplanin in combination with gentamicin or netilmicin administered once a day.

In conclusion, the efficacy shown in our experiments with the combination of teicoplanin and gentamicin, both administered once a day, indicates that this combination could be valuable in

the treatment of enterococcal endocarditis and may be useful as home therapy in cases of uncomplicated enterococcal endocarditis, reducing the time and cost of hospital care. Further studies are needed to establish the real efficacy of this therapeutic approach in humans with enterococcal endocarditis.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Celine Cavallo for English-language assistance. This work was supported in part by Fondo Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FISS grant no. 96/175 and 94/0534).

REFERENCES

- Anhalt, J. P., and J. A. Washington II. 1985. Bactericidal test, p. 731-773. In J. A. Washington II (ed.), *Laboratory procedures in clinical microbiology*, 2nd ed. Springer-Verlag, New York, N.Y.
- Bisno, A. L., W. E. Dismukes, D. T. Durack, E. L. Kaplan, A. W. Karchmer, D. Kaye, S. H. Rahimtoola, M. A. Saude, J. P. Sandford, C. Watanakunakorn, and W. R. Wilson. 1989. Antimicrobial treatment of infective endocarditis due to viridans streptococci, enterococci and staphylococci. *JAMA* 261:1471-1477.
- Blatter, M., U. Flückiger, J. Entenza, M. P. Glauser, and P. Francioli. 1993. Simulated human serum profiles of one daily dose of ceftriaxone plus netilmicin in treatment of experimental streptococcal endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31:971-977.
- Brandt, C. M., M. S. Rouse, N. W. Lane, N. W. Stratton, W. R. Wilson, and J. M. Steckelberg. 1996. Effective treatment of multidrug-resistant enterococcal experimental endocarditis with combinations of cell wall-active agents. *J. Infect. Dis.* 173:909-913.
- Chambers, H. F., and S. Kennedy. 1990. Effects of dosage, peak and trough concentrations in serum, protein binding, and bactericidal rate on efficacy of teicoplanin in a rabbit model of endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:510-514.
- Durack, D. T., and P. B. Beeson. 1972. Experimental bacterial endocarditis I: colonization of a sterile vegetation. *Br. J. Exp. Pathol.* 53:44-49.
- Durack, D. T., and P. B. Beeson. 1972. Experimental bacterial endocarditis II: survival of bacteria in endocardial vegetation. *Br. J. Exp. Pathol.* 53:50-53.
- Durack, D. T., P. B. Beeson, and R. G. Petersdorf. 1973. Experimental bacterial endocarditis III: Production and progress of the disease in rabbits. *Br. J. Exp. Pathol.* 54:142-151.
- Durack, D. T. 1975. Experimental bacterial endocarditis IV: structure and evolution of very early lesions. *J. Pathol.* 115:81-89.
- Facklam, R. R., and M. D. Collins. 1989. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J. Clin. Microbiol.* 27:731-734.
- Fautin, B., and C. Carbon. 1990. Importance of the aminoglycoside dosing regimen in the penicillin-netilmicin combination for treatment of *Enterococcus faecalis*-induced experimental endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:2387-2391.
- Fekety, R. 1995. Vancomycin and teicoplanin, part I, p. 346-354. In G. L. Mandell, J. E. Bennett, and R. Dolin (ed.), *Principles and practice in infectious diseases*, 4th ed. Churchill Livingstone, Inc., New York, N.Y.
- Francioli, P., and M. P. Glauser. 1993. Synergistic activity of ceftriaxone combined with netilmicin administered in one daily dose in the treatment of experimental streptococcal endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:207-212.
- Francioli, P., W. Rouch, and D. Stambouljan. 1995. Treatment of streptococcal endocarditis with a single daily dose of ceftriaxone and netilmicin for 14 days: a prospective multicenter study. *Clin. Infect. Dis.* 21:1406-1410.
- Garrison, P. K., and L. R. Freedman. 1970. Experimental endocarditis I. Staphylococcal endocarditis in rabbits resulting from placement of a polyethylene catheter in right side of the heart. *Yale J. Biol. Med.* 42:394-410.
- Gavaldá, J., A. Palóssa, B. Almirante, M. Laguarda, E. Crespo, I. Piu, and F. Fernández. 1995. Effect of gentamicin dosing interval on gentamicin plus penicillin therapy of viridans streptococcal experimental endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:2098-2103.
- Gavaldá, J., P. J. Cardona, J. A. Capdevila, M. Laguarda, B. Almirante, C. Pignat, E. Crespo, and A. Palóssa. 1996. Treatment of experimental endocarditis due to *Enterococcus faecalis* using once-daily dosing regimen of gentamicin plus simulated profiles of ampicillin in human serum. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:173-178.
- Gavaldá, J., C. Torres, C. Tenorio, P. López, M. Zaragoza, J. A. Capdevila, B. Almirante, F. Ruiz, N. Borrrell, C. Pignat, F. Baguers, and A. Palóssa. 1999. Efficacy of ampicillin plus ceftriaxone in treatment of experimental endocarditis due to *Enterococcus faecalis* strains highly resistant to amino-
- glycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:639-646.
- Gerber, A. U., H. P. Brugger, C. Feller, T. Stritzko, and B. Stalder. 1986. Antibiotic therapy of infections due to *Pseudomonas aeruginosa* in normal and granulocytopenic mice: comparison of murine and human pharmacokinetics. *J. Infect. Dis.* 153:90-97.
- Gerber, A. U., T. Stritzko, C. Segessenmann, and B. Stalder. 1991. Simulation of human pharmacokinetics profiles in mice, and impact on antimicrobial efficacy of netilmicin, ticarcillin and ceftazidime in the peritonitis-septicemia model. *Scand. J. Infect. Dis.* 74:195-230.
- Houlihan, H. H., D. P. Stokes, and M. J. Rybak. 2000. Pharmacodynamics of vancomycin and ampicillin alone and in combination with gentamicin once daily or thrice daily against *Enterococcus faecalis* in an in vitro infection model. *J. Antimicrob. Chemother.* 46:79-86.
- Legget, J. E., B. Fautin, S. Ebert, K. Totsuka, W. Calame, H. Mattie, and W. A. Craig. 1989. Comparative antibiotic dose-effect relations at several dosing intervals in murine pneumonitis and thigh-infection models. *J. Infect. Dis.* 159:281-292.
- Legget, J. E., S. Ebert, B. Fautin, and W. A. Craig. 1991. Comparative dose-effect relations at several dosing intervals or beta-lactam, aminoglycoside and quinolone antibiotics against gram-negative bacilli in murine thigh-infection and pneumonitis models. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 74:179-184.
- Lepout, C., C. Perronne, P. Massip, P. Canton, P. Leclercq, E. Bernard, P. Lamm, J. J. Garand, and J. L. Vilhe. 1989. Evaluation of teicoplanin for treatment of endocarditis caused by gram-positive cocci in 20 patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:879-876.
- Lewis, P. J., P. Martino, G. Mouton, and I. Harding. 1995. Teicoplanin in endocarditis: a multicentre, open European study. *Chemotherapy* 41:399-411.
- Marangos, M. N., D. P. Nicolau, R. Quintillani, and C. H. Nightingale. 1997. Influence of gentamicin dosing interval on the efficacy of penicillin-containing regimens in experimental *Enterococcus faecalis* endocarditis. *J. Antimicrob. Chemother.* 39:519-522.
- Martino, P., M. Venditti, A. Micozzi, C. Brandimarte, G. Gentile, C. Santini, and P. Serra. 1989. Teicoplanin in the treatment of gram-positive bacterial endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:1329-1334.
- Møllering, R. C., Jr. 1995. *Enterococcus* species, *Streptococcus bovis*, and *Leuconostoc* species, p. 1826-1860. In G. E. Mandell, J. E. Bennett, and R. Dolin (ed.), *Principles and practice of infectious diseases*, 4th ed. Churchill Livingstone, Inc., New York, N.Y.
- Munckhof, W. J., M. L. Grayson, and J. D. Turnidge. 1996. A meta-analysis of studies on the safety and efficacy of aminoglycosides given either once daily or as divided doses. *J. Antimicrob. Chemother.* 37:645-663.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests on bacteria that grow aerobically, 4th ed. Approved standard M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- Perlman, B. B., and L. R. Freedman. 1971. Experimental endocarditis II. Staphylococcal infection of the aortic valve following placement of a polyethylene catheter in the left side of the heart. *Yale J. Biol. Med.* 44:206-213.
- Perlman, B. B., and L. R. Freedman. 1971. Experimental endocarditis III: natural history of catheter induced staphylococcal endocarditis following catheter removal. *Yale J. Biol. Med.* 44:214-224.
- Presterl, E., W. Graninger, and A. Georgopoulos. 1993. The efficacy of teicoplanin in the treatment of endocarditis caused by gram-positive bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 31:755-766.
- Sahn, D. F., and C. Torres. 1988. Effects of medium and inoculum variations on screening for high-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus faecalis*. *J. Clin. Microbiol.* 26:250-256.
- Saleh-Mghir, A. A. C., Crémieux, J. M., Vallots, M., Muffat-Joly, C., Devine, and C. Carbon. 1992. Optimal aminoglycoside dosing regimen for penicillin-tobramycin synergism in experimental *Streptococcus adjuvans* endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:2043-2047.
- Schwab, S., and J. Blaser. 1996. Once- versus thrice-daily netilmicin combined with amoxicillin, penicillin, or vancomycin against *Enterococcus faecalis* in a pharmacodynamic in vitro model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:2258-2261.
- Sullivan, P. M., M. G. Tanber, C. J. Hackborth, and M. A. Saude. 1985. Therapeutic efficacy of teicoplanin in experimental enterococcal endocarditis in rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27:135-136.
- Venditti, M., A. Tarasi, A. Capone, M. Galle, F. Menichetti, P. Martino, and P. Serra. 1997. Teicoplanin in the treatment of enterococcal endocarditis: clinical and microbiological study. *J. Antimicrob. Chemother.* 40:449-452.
- Vogelman, B., S. Gudmundsson, J. Leggett, J. Turnidge, S. Ebert, and W. A. Craig. 1988. Correlation of antimicrobial pharmacokinetic parameters with therapeutic efficacy in an animal model. *J. Infect. Dis.* 158:831-847.
- Wilson, A. P. R., and H. Gays. 1996. Treatment of endocarditis with teicoplanin: a retrospective analysis of 104 cases. *J. Antimicrob. Chemother.* 38:507-521.

4. Estudio 3:

Efficacy of Ceftriaxone and Gentamicin Given Once a Day by Using Human-Like Pharmacokinetics in Treatment of Experimental Staphylococcal Endocarditis.

Joan Gavalda, Pedro López, Teresa Martín, Xavier Gomis, José Luis Ramírez, Carlos Azuaje, Benito Almirante y Albert Pahissa.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2002. Vol. 46: p. 378–384.

4.1. Objetivos concretos del Estudio 3

1. Desarrollar un modelo matemático basado en un patrón farmacocinético bicompartimental abierto, que permita determinar cuáles son las dosis a infundir al animal de experimentación mediante un sistema de bombas controladas por ordenador, para simular los perfiles farmacocinéticos de ceftriaxona y de gentamicina ambas administradas en una única dosis a humanos. Para ello, se evaluaron los parámetros farmacocinéticos de estos dos antibióticos en conejos sanos, y tras esto se administró la ceftriaxona a los animales de una forma en la que se reprodujera en el suero del animal el perfil sérico que se consigue en humanos tras una administración de 2 g de ceftriaxona y de 4,5 mg/kg/24 h de gentamicina.
2. Evaluar la eficacia terapéutica de la combinación de ceftriaxona y gentamicina, administrada a los animales en una dosis única diaria, simulando los perfiles farmacocinéticos que se obtienen en los humanos con ambos antibióticos, para el tratamiento de la endocarditis experimental causada por *S. aureus*.

Efficacy of Ceftriaxone and Gentamicin Given Once a Day by Using Human-Like Pharmacokinetics in Treatment of Experimental Staphylococcal Endocarditis

Joan Gavaldà,* Pedro López, Teresa Martín, Xavier Gomis, José Luis Ramírez, Carlos Azuaje, Benito Almirante, and Albert Pahissa

Infectious Diseases Research Laboratory, Infectious Diseases Division, Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Received 22 June 2001/Returned for modification 5 September 2001/Accepted 7 November 2001

We compared the efficacy of ceftriaxone combined with gentamicin, both given once a day, with that of cloxacillin given every 4 h plus gentamicin given once a day or in three daily doses (t.i.d.) for the treatment of experimental methicillin-susceptible staphylococcal endocarditis. The antibiotics were administered by using human-like (H-L) pharmacokinetics that simulated the profiles of these drugs in human serum. Animals with catheter-induced endocarditis were infected intravenously with 10^5 CFU of *Staphylococcus aureus* S5 (MICs and minimal bactericidal concentrations of cloxacillin, ceftriaxone, and gentamicin, 0.5 and 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 4 and 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and 0.5 and 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively). The animals were then treated for 24 h with cloxacillin at a dose of 2 g that simulated H-L pharmacokinetics (H-L 2 g) every 4 h alone or combined with gentamicin (administered at doses of H-L 1 mg/kg of body weight every 8 h or H-L 4.5 mg/kg every 24 h) or with ceftriaxone at H-L 2 g every 24 h alone or combined with gentamicin (administered at doses of H-L 1 mg/kg every 8 h or H-L 4.5 mg/kg every 24 h). The results of therapy for experimental endocarditis due to the S5 strain showed that (i) cloxacillin alone is more effective than ceftriaxone alone in reducing the bacterial load ($P < 0.01$), (ii) the combination of cloxacillin or ceftriaxone with gentamicin is more effective than each of these drugs alone ($P < 0.01$), and (iii) Ceftriaxone H-L plus gentamicin H-L 4.5 mg/kg, both administered every 24 h, showed efficacy similar to that of the "gold standard," cloxacillin H-L plus gentamicin H-L 1 mg/kg t.i.d. ($P > 0.05$). An increase in the interval of administration of gentamicin to once daily resulted in a reduction in the numbers of bacteria in the vegetations equivalent to that achieved with the recommended regimen of cloxacillin plus gentamicin t.i.d. in the treatment of experimental endocarditis due to methicillin-susceptible *S. aureus*. Ceftriaxone plus gentamicin, both administered once a day, may be useful for home-based therapy for selected cases of staphylococcal endocarditis.

In the preantibiotic era, endocarditis due to *Staphylococcus aureus* was almost universally fatal. Nowadays, even though antistaphylococcal antibiotics are available, endocarditis still carries a high rate of morbidity and mortality (6, 35). Anti-staphylococcal penicillins such as oxacillin or methicillin are the antibiotics of choice for the treatment of infections due to methicillin-susceptible strains. The potential of narrow-spectrum cephalosporins, such as cefazolin and cephalothin, is evident from experimental studies, but few studies have investigated broad-spectrum cephalosporins in the treatment of experimental endocarditis due to methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) (21). The efficacies of β -lactams combined with aminoglycosides for the treatment of MSSA endocarditis have been demonstrated in experimental studies (29, 30), but use of the combination is not recommended in humans (38). It is accepted that aminoglycosides must be administered for a minimum of 15 days when treating staphylococcal prosthetic endocarditis (1). However, to avoid the potential toxic effects of prolonged aminoglycoside therapy, new treatment regimens, such as those that increase the aminoglycoside dosing interval,

are being studied. Pharmacodynamic data obtained from animal models (17, 18, 37) have shown concentration-dependent killing by the aminoglycosides, which supports the idea that administration of these drugs once a day might be more effective. Along this line, gentamicin given once a day has been shown to be effective against experimental endocarditis due to viridans group streptococci (2, 11, 28) and experimental endocarditis due to *Enterococcus faecalis* (13, 20) and in vitro simulations of enterococcal endocarditis (14, 32). To date, the efficacy of gentamicin administered once a day against MSSA has not been evaluated.

The recommended treatment for left native valve endocarditis due to MSSA is nafcillin or cloxacillin for 4 to 6 weeks (38). This regimen implies prolonged treatment in a hospital since administration on a home-therapy basis is complicated. It would be desirable to find alternatives that permit more convenient once-a-day administration for outpatient treatment. The prolonged half-life ($t_{1/2}$) of ceftriaxone or teicoplanin allows once-a-day administration, and combinations of these drugs with aminoglycosides also administered once a day could be used as outpatient therapy for endocarditis. In experimental and clinical studies investigating treatments for streptococcal endocarditis, the efficacy of ceftriaxone plus aminoglycosides, both administered once a day, was similar to that of penicillin plus aminoglycosides 2, 8, 9; (H. F. Chambers, S. Kennedy, M.

* Corresponding author. Mailing address: Servei de Malalties Infeccioses, Hospital Vall d'Hebron. Avda. Vall d'Hebron, 119-129, 08035 Barcelona, Spain. Phone: 34-93-4894033. Fax: 34-93-2746057. E-mail: gavaldà@hg.vhebron.es.

Fournier, M. S. Rouse, and W. R. Wilson, Program Abstr. 30th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. 701, p. 203, 1990; C. W. Dorschner, B. M. Tallan, M. S. Rouse, J. M. Steckelberg, H. C. Chambers, and W. R. Wilson, Program Abstr. 30th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. 700, p. 203, 1990). Additionally, the efficacy of teicoplanin plus gentamicin both administered once a day was similar to that of the standard therapy of ampicillin plus gentamicin in a rabbit model of enterococcal endocarditis (20).

In the case of staphylococcal endocarditis due to methicillin-sensitive strains, ceftriaxone plus gentamicin might be feasible as home-based therapy for selected patients with this condition. Once-a-day administration of this combination has not been studied in the treatment of MSSA experimental endocarditis. The aim of the present study was to evaluate the efficacy of ceftriaxone plus gentamicin, both administered once a day, by using human-like (H-L) pharmacokinetics in the treatment of experimental endocarditis due to MSSA in rabbits.

(This work was presented in part at the 35th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, Calif., 17 to 20 September, 1995 [J. Gavalda, M. LaGuarda, J. A. Capdevila, L. Pou, E. Crespo, and A. Pahissa, Abstr. 35th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. B44, p. 33, 1995].)

MATERIALS AND METHODS

In vitro susceptibility studies. We studied five methicillin-susceptible, non beta-lactamase-overproducing *S. aureus* strains isolated from patients with endocarditis. The *in vivo* studies were performed with the S5 strain. Working stock cultures were kept frozen at -70°C in double-strength skin milk medium (Difco Laboratories, Detroit, Mich.). Before each experiment, one aliquot was thawed and inoculated onto 5% sheep blood Columbia agar plates (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). Cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB; bioMérieux) was used as the test medium. The following drugs were supplied by the indicated manufacturers: gentamicin, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.; cloxacillin, Antibioticos SA Madrid, Spain; and ceftriaxone, Roche SA, Madrid, Spain. Antibiotic solutions were prepared fresh on the day of use, following the recommendations of the manufacturers.

MICs were determined in duplicate by the microdilution method, in keeping with the procedures of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (24). Minimum bactericidal concentrations (MBCs) were determined after 48 h of incubation of 0.025 ml each from the control well, from the first well with visible growth, and from all wells without visible growth plated onto 5% sheep blood Columbia agar plates for determination of the colony counts. *S. aureus* ATCC 29213 was used as the test control strain. The MBC was defined as the lowest concentration of antibiotic that killed at least 99.9% of the initial inoculum (16).

To perform the time-kill synergy studies, we followed the method described by Sahn and Torres (27). Prior to inoculation, each tube of fresh, prewarmed CAMHB was supplemented with gentamicin (final concentrations, 0.125, 0.5, and 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) either alone or in combination with cloxacillin (final concentrations, 0.25 and 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or ceftriaxone (final concentrations, 4 and 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$). A positive-growth tube without antibiotics was used as a control. The test tubes were inoculated with 10^7 CFU of *S. aureus* in the logarithmic phase of growth per ml and incubated at 37°C in room air, and the \log_{10} number of CFU per milliliter was determined after 0, 4, and 24 h of incubation. Synergy was defined as a $\geq 2 \log_{10}$ decrease in the numbers of CFU/ml between the test tube with the combination and the test tube with the most active agent alone after 24 h, and the number of surviving organisms in the presence of the combination had to be $\geq 2 \log_{10}$ CFU/ml below the starting inoculum. The combination was considered to have bactericidal activity when a $\geq 3 \log_{10}$ reduction in colony counts was reached.

Animals. New Zealand White rabbits (body weight, 2 kg) were obtained from BK Universal (Barcelona, Spain). The animals were housed in the animal facility of our hospital, which is equipped with automatic air exchange with a HEPA filter and a circadian light cycle. They were nourished with sterile water and food ad libitum.

TABLE 1. Comparison of pharmacokinetic parameters of cloxacillin, gentamicin at two doses and ceftriaxone in *in vivo* studies

Treatment and model	k_{el} (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	AUC ₀₋₂₄ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$)
Ceftriaxone at 2 g i.v. ^a			
Rabbit ^b	0.4 \pm 0.04	1.66 \pm 0.15	260.72
Human ^c	0.1	6.92	1,506.3
Rabbit, human-like ^d	0.09 \pm 0.002	7.21 \pm 0.19	1,819 \pm 82.72
Cloxacillin at 2 g i.v.			
Rabbit	2.78 \pm 0.5	0.25 \pm 0.05	71.94
Human	1.155	0.6	173.16
Rabbit, human-like	1.05 \pm 0.3	0.66 \pm 0.02	191.52 \pm 14.3
Gentamicin at 1 mg/kg i.v.			
Rabbit	0.64 \pm 0.22	1.09 \pm 0.3	9.6
Human	0.27	2.54	18
Rabbit, human-like	0.27 \pm 0.034	2.5 \pm 0.37	15.80 \pm 1.24
Gentamicin at 4.5 mg/kg i.v.			
Rabbit	0.64 \pm 0.22	1.09 \pm 0.3	24.05
Human	0.25	2.8	66.2
Rabbit human-like	0.24 \pm 0.014	2.0 \pm 0.18	76.84 \pm 17.7

^a The pharmacokinetic parameters were estimated on the basis of an open one-compartment model.

^b $t_{1/2}$ and k_{el} data are for healthy rabbits treated with 100 mg of cloxacillin per kg, 6 mg of gentamicin per kg, and 50 mg of ceftriaxone per kg i.v. The AUC₀₋₂₄ was calculated from the data for an ideal profile obtained with a C_0 of 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for cloxacillin, a concentration at 0.5 h ($C_{0.5}$) of 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for gentamicin at a dose of 1 mg/kg, a concentration at 0.5 h of 18 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for gentamicin at 4.5 mg/kg, and a C_0 of 256.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for ceftriaxone and the k_{el} of each drug in rabbits.

^c k_{el} , $t_{1/2}$, and AUC₀₋₂₄ were obtained from an ideal profile in human serum of 2 g of cloxacillin, 1 and 4.5 mg of gentamicin per kg, and 2 g of ceftriaxone (22, 25, 31).

^d Data are for H-L pharmacokinetics of 2 g of cloxacillin, 1 and 4.5 mg of gentamicin per kg, and 2 g of ceftriaxone.

Pharmacokinetic studies. Cloxacillin, gentamicin, and ceftriaxone were administered by using a system that produces pharmacokinetics in rabbit serum that mimic the profile in human serum after an intravenous (i.v.) infusion of cloxacillin at 2 g every 4 h, ceftriaxone at 2 g every 24 h, gentamicin at 1 mg/kg of body weight every 8 h, or gentamicin at 4.5 mg/kg every 24 h. We used a computer-controlled infusion pump (Alice King) that delivered decreasing quantities of drug. The computer software was written by our group. With this program, the flow rate of the pump can be changed automatically and flow-rate sequences can be repeated as often as required. The approach involved three steps: (i) estimation of cloxacillin, ceftriaxone, and gentamicin pharmacokinetic parameters in the rabbit; (ii) application of a mathematical model to determine the infusion rate required to reproduce human pharmacokinetics in the animals; and (iii) *in vivo* experimental pharmacokinetic studies performed to simulate in rabbits the pharmacokinetic profiles of cloxacillin, ceftriaxone, and gentamicin in humans.

The pharmacokinetic studies which led to the H-L pharmacokinetics of ceftriaxone and gentamicin in rabbits, including the explanation of the mathematical model used on the basis of an open two-compartment model, have been described previously (12, 20). The pharmacokinetic data from the human-adapted model of 2 g of ceftriaxone and gentamicin at 1 or 4.5 mg/kg given i.v. in rabbits are shown in Table 1 and Fig. 1. The profile in serum and the pharmacokinetic parameters of ceftriaxone or gentamicin in rabbits administered by use of this model were similar to those of i.v. ceftriaxone or gentamicin in humans (12, 20).

The first step needed to obtain H-L pharmacokinetics of cloxacillin involved the estimation of cloxacillin pharmacokinetic parameters in the rabbit. Blood was drawn from a carotid catheter at 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, and 180 min after administration of an i.v. dose of 100 mg of cloxacillin per kg to five healthy rabbits. The test tubes with the blood were centrifuged at $1,500 \times g$ for 10 min, and the serum was removed and stored at -70°C . All the serum samples were processed in the same assay. Cloxacillin concentrations were determined by the bioassay method with *S. aureus* ATCC 6538P as the test organism and antibiotic agar 5 as the assay medium. Standard curves were determined with cloxacillin solutions (10, 14, 18, 22, and 26 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in pooled rabbit serum. The serum samples were also diluted in pooled rabbit serum so that their inhibition zone size diameters would be within the range of those for the standard curve. The

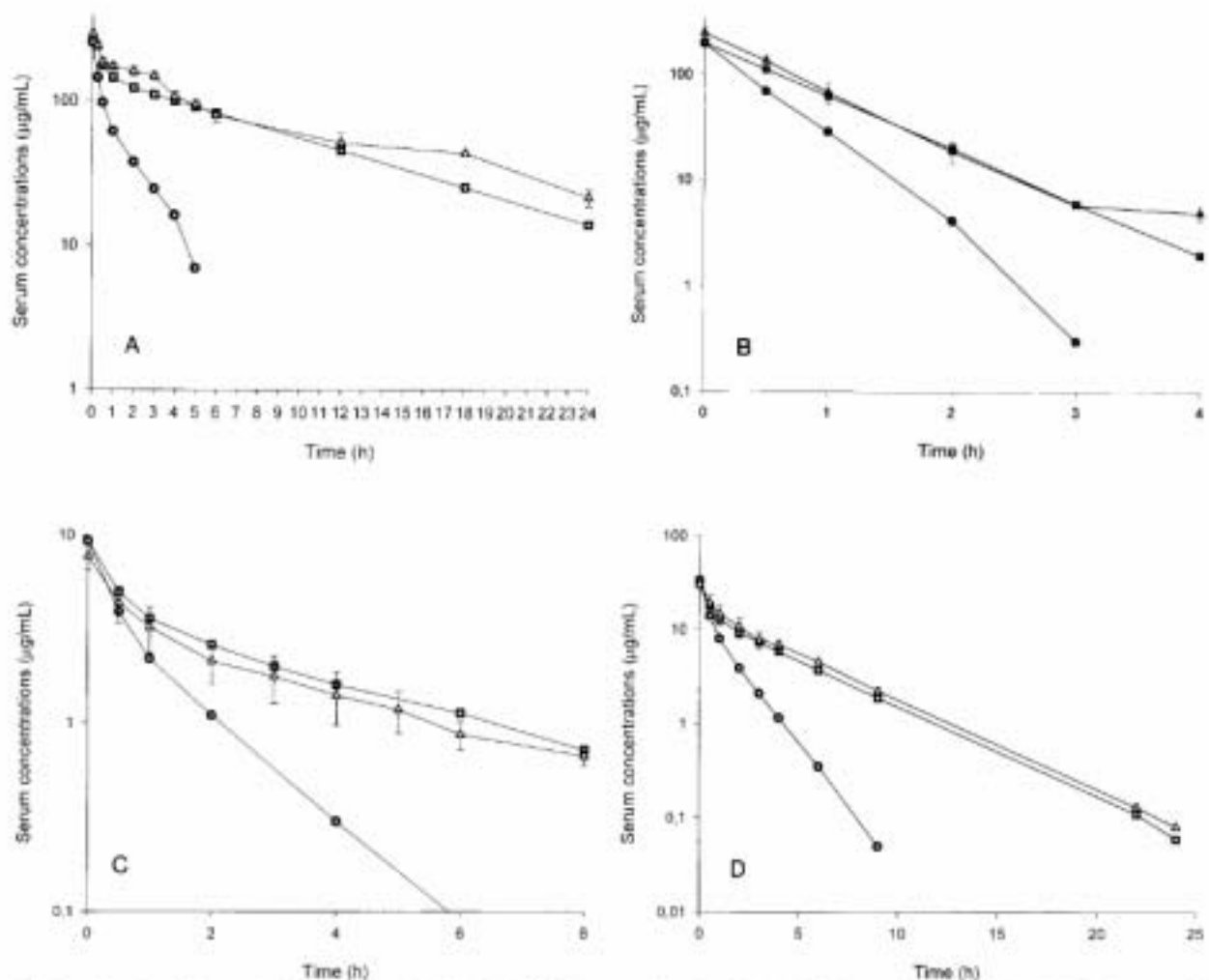


FIG. 1. Results of pharmacokinetic studies in rabbits with H-L pharmacokinetics of 2 g of ceftriaxone (A), 2 g of cloxacillin (B), gentamicin at 1 mg/kg (C), and gentamicin at 4.5 mg/kg (D). Circles, ideal pharmacokinetics in rabbits; squares, pharmacokinetics in humans; triangles, H-L pharmacokinetics in rabbits.

concentrations in serum were extrapolated from the standard curve. The standard samples were studied in quintuplicate, and the serum samples were studied in triplicate. The results were expressed as micrograms per milliliter of blood. The linearity (r^2) of the standard curve was 0.95. The sensitivity of the assay was 3.1 $\mu\text{g/ml}$ of sample, and the between- and within-day coefficients of variation for replicates ($n = 7$) at 10 and 40 $\mu\text{g/ml}$ were less than 5%. The serum elimination constant rate (k_{el}) and the volume of distribution (V) in liters per kilogram) of cloxacillin in rabbit serum on the basis of an open one-compartment model were determined by using a nonlinear least-squares regression analysis of the concentration in serum-versus-time curve.

The second step was application of a mathematical model to determine the doses required to reproduce in rabbits the drug levels observed in humans after administration of 2 g of cloxacillin. The mathematical model for administration of drugs with H-L pharmacokinetics on the basis of an open one-compartment model has been published previously (11, 13). Finally, studies were done to simulate in healthy rabbits the pharmacokinetic profile of 2 g of cloxacillin given every 4 h in humans. Briefly, two polyethylene catheters (inner diameter, 0.81 mm; outer diameter, 1.27 mm; Portex SA, Hythe, England) were inserted, one into the carotid artery (sampling) and the other into the vena cava through the jugular vein (infusion). Both lines were tunneled subcutaneously and brought to the interscapular region. The external portion of the jugular catheter was connected to a flowthrough swivel and then to a computer-controlled infusion pump system, as previously described (12, 20). The pump system was set up to deliver

an i.v. infusion at previously calculated flow rates to simulate the kinetics in humans of 2 g of cloxacillin given i.v. This study was done with five rabbits. To determine serum cloxacillin concentrations, 2 ml of blood was sampled through the carotid artery catheter at 0, 0.5, 1, 2, 3, and 4 h after the start of infusion. The concentrations in serum were then assayed by the microbiological bioassay described above. Several pharmacokinetic parameters were estimated on the basis of an open one-compartment model to compare the pharmacokinetics of cloxacillin in rabbits, in the human-adapted model, and in humans. The pharmacokinetic parameters of cloxacillin were calculated with a concentration at time zero (C_0) of 150 $\mu\text{g/ml}$.

In vivo efficacy studies in the model of experimental endocarditis. Experimental aortic valve infective endocarditis was induced in male New Zealand rabbits (weight, 2 to 2.3 kg) as described previously (10, 11). Briefly, a polyethylene catheter was inserted through the right carotid artery into the left ventricle and was kept in place during the experiment. On the same day, one or two catheters (inner diameter, 0.81 mm; outer diameter, 1.27 mm; Portex SA), depending on the treatment group, were inserted into the inferior vena cava through the jugular vein by the same technique mentioned above (10, 11) to administer the different antimicrobials. The infusion pump delivered 2 ml of 0.9% saline to keep the catheters patent until the beginning of antimicrobial administration. Twenty-four hours after placement of the intracardiac catheter, the different groups of animals were infected via the marginal ear vein with 1 ml of a saline solution containing 10^5 CFU of *S. aureus* S5 in the stationary phase of growth. Blood (1

TABLE 2. Results of time-kill curve studies for combinations of ceftriaxone and gentamicin against five strains of *S. aureus*

Antimicrobial agent (dose [mg/kg])	Change in log ₁₀ CFU/ml at the indicated times with respect to the initial inoculum									
	<i>S. aureus</i> S5 (40.5)*		<i>S. aureus</i> M1.2 (16/0.5)		<i>S. aureus</i> D22-1 (40.5)		<i>S. aureus</i> AT-4 (4/1)		<i>S. aureus</i> O16-3 (40.5)	
	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h
Growth control	+2.46	+2.94	+1.07	+1.49	+0.12	+1.83	+1.08	+1.47	+2.1	+3.04
Ceftriaxone (4)	+0.20	+0.42	+0.62	+1.02	-1.38	-2.15	-2.13	+0.04	-0.49	-1.31
Gentamicin (0.5)	-0.7	-0.06	+0.98	+1.35	-1.19	-3.23	-0.93	+0.56	-3.44	+1.76
Gentamicin (1)	-1.82	-0.76	+0.86	+1.09	-1.51	-3.25	-4.73	+0.1	-2.31	-1.38
Ceftriaxone (4) + gentamicin (0.5)	-2.58	-4.59	-0.06	-2.51	-1.32	-5.44	-3.47	-4.09	-2.03	-5.17
Ceftriaxone (4) + gentamicin (1)	-2.87	-3.82	-0.03	-2.21	-1.51	-5.84	-4.18	-5.23	-3.45	-5.49

* Values in parentheses are MIC of ceftriaxone/MIC of gentamicin, in micrograms per milliter.

ml) was obtained 16 h after infection and just before the initiation of antimicrobial therapy to confirm the presence of endocarditis. The blood specimen was mixed with 20 ml of molten tryptic soy agar (Difco Laboratories). The agar plates were incubated for 48 h at 37°C in room air, and the presence of staphylococci was interpreted as indicative of infective endocarditis.

Antimicrobial therapy was started 16 h after inoculation and was maintained for 24 h. Cloxacillin, ceftriaxone, and gentamicin were administered with the computer-controlled infusion pump system. The infected rabbits were randomized into the following treatment groups: control without treatment; ceftriaxone at a dose of 2 g that simulated H-L pharmacokinetics (H-L 2 g) every 24 h i.v., cloxacillin at H-L 2 g every 4 h i.v., cloxacillin at H-L 2 g every 4 h i.v. plus gentamicin at H-L 1 mg/kg every 8 h i.v., cloxacillin at H-L 2 g every 4 h i.v. plus gentamicin at H-L 4.5 mg/kg every 24 h i.v., and ceftriaxone at H-L 2 g every 24 h i.v. plus gentamicin at H-L 4.5 mg/kg every 24 h i.v. After 24 h of treatment and 6 h after the end of the antibiotic infusion, the rabbits were killed with a lethal i.v. injection of sodium pentothal. The chest was immediately opened, the heart was excised and opened, and the aortic valve vegetation was removed aseptically. The animals in the control group were killed 24 h after infection. Only those animals with proper placement of the catheter, macroscopic evidence of vegetations at the time of death, and *S. aureus* in cultures of blood obtained before the start of antimicrobial therapy were included in the study. The vegetations were rinsed with saline solution, weighed, and homogenized in 2 ml of tryptone soy broth (Difco Laboratories) in a tissue homogenizer (Stomacher 80). Homogenates were quantitatively cultured onto 5% sheep blood Columbia agar plates. In order to surmount the carryover effect, the vegetations of the animals treated with cloxacillin or ceftriaxone in combination with gentamicin were washed by centrifugation of the homogenate at 2,500 × g for 10 min. The supernatant was removed, and the bacterial pellet was resuspended in drug-free medium. We used two washings to ensure extensive drug removal. The homogenates of vegetations from animals treated with cloxacillin or ceftriaxone alone were not washed because we needed a 10⁻⁷ dilution to obtain a culture of organisms that could be counted. The plates were incubated for 48 h at 37°C in room air. The results were expressed as the number of log₁₀ CFU of *S. aureus* S5 per gram of vegetation. Bacterial densities in valvular vegetations calculated to be between 0 and 2 log₁₀ CFU/g were reported as 2 log₁₀ CFU/g rather than 0 log₁₀ CFU/g because of the potential errors associated with the low weight of the valvular tissue. The results were expressed as the mean and the 95% confidence interval of the number of log₁₀ CFU of *S. aureus* S5 per gram of vegetation. Differences in the number of log₁₀ CFU of staphylococci per gram of vegetation were compared by one-way analysis of variance. When the *F* value was significant, the data for each treatment group were compared with those for the control group and each of the other treatment groups by Scheffé's test. *P* values less than or equal to 0.05 were considered significant.

RESULTS

In vitro susceptibility studies. The MICs and MBCs of cloxacillin, ceftriaxone, and gentamicin for the *S. aureus* S5 strain were 0.5 and 2 µg/ml, 4 and 8 µg/ml, and 0.5/1 µg/ml, respectively. The range of MICs of these antibiotics for the other four

strains of *S. aureus* were 0.5 to 1 µg/ml for cloxacillin, 4 to 16 µg/ml for ceftriaxone, and 0.5 to 1 µg/ml for gentamicin.

The results of the time-kill studies for the combination ceftriaxone plus gentamicin are shown in Table 2. The combination of 4 µg of ceftriaxone per ml plus 0.5 or 1 µg of gentamicin per ml resulted in synergistic activity against all five strains studied and was bactericidal for four of the strains, including strain S5. The graphic representation of the time-kill curve for strain S5 is shown in Fig. 2.

Pharmacokinetic studies. The rabbit pharmacokinetic data for ceftriaxone, determined with seven healthy rabbits that had received one i.v. bolus dose of 50 mg/kg, were as follows (values are means ± standard deviations [SDs]): distribution phase (α), 3.7 ± 0.41 h⁻¹; elimination phase (β), 0.42 ± 0.07 h⁻¹; k_{21} (rabbit elimination disposition rate constant at the distribution phase on the basis of an open two-compartment pharmacokinetic model), 1.53 ± 0.3 h⁻¹; k_{13} (rabbit elimination constant from the central compartment, per hour), 1.07 ± 0.3 h⁻¹; and *V*, 0.16 ± 0.01 liter/kg. The concentration profile in human serum produced by an i.v. injection of 2 g of ceftriaxone was successfully simulated in rabbits (Fig. 1A). The pharmacokinetic parameters obtained from the human-adapted model were similar to those for 2 g of ceftriaxone administered i.v. in humans (Table 1). This resulted in peak and trough ceftriaxone levels in rabbit serum (mean ± SD) of 242.7 ± 17.6 µg/ml at 15 min and 21.6 ± 2.9 µg/ml at 24 h, respectively.

The pharmacokinetic data for cloxacillin after an administration of an i.v. bolus of 100 mg/kg to five healthy rabbits were as follows: k_{el} , 2.78 h⁻¹; elimination $t_{1/2}$ ($t_{1/2\beta}$) 0.25 h; and the area under the concentration-time curve from time zero to infinity (AUC_{0-∞}), 71.94 mg·h/ml. The pharmacokinetic profile in human serum after i.v. administration of 2 g of cloxacillin was also well reproduced in rabbits (Fig. 1B). Table 2 shows the pharmacokinetic data for the human-adapted model (k_{el} , 1.05 ± 0.03 h⁻¹, $t_{1/2\beta}$, 0.66 ± 0.02 h; AUC_{0-∞} 191.52 ± 31.43 mg·h/ml), which were similar to those of 2 g of cloxacillin administered i.v. in humans.

The pharmacokinetic data for 6 mg of gentamicin per kg given i.v. to nine healthy rabbits were as follows: α , 2.96 ± 0.86 h⁻¹; β , 0.6 ± 0.13 h⁻¹; k_{21} , 1.49 ± 0.23 h⁻¹; k_{13} , 1.14 ± 0.12 h⁻¹; and *V*, 0.2 ± 0.05 liter/kg. The results for the human-adapted model in rabbits, which reproduce the pharmacoki-

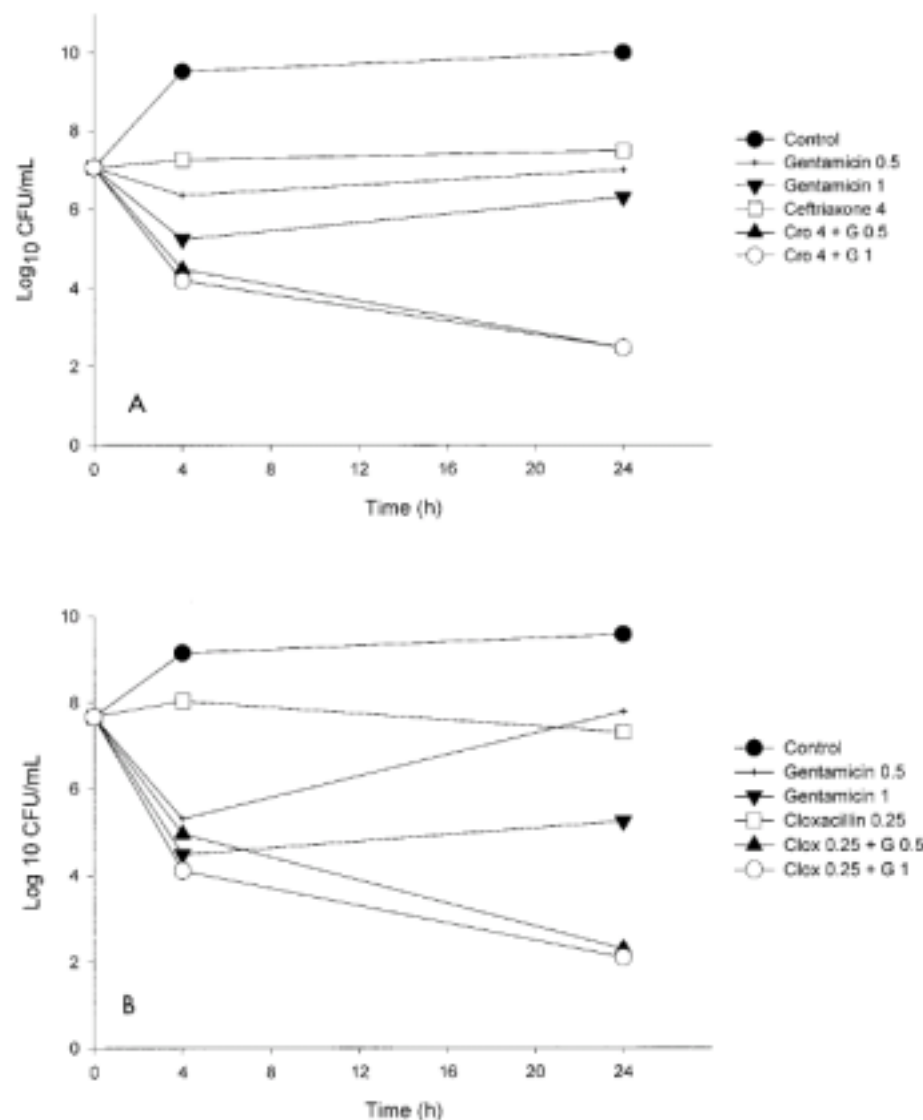


FIG. 2. (A) Time-kill curve for ceftriaxone (Cro) at 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and gentamicin (G) at 0.5 and 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for the treatment of endocarditis caused by *S. aureus* S5. (B) Time-kill curve for cloxacillin (Clox) at 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and gentamicin (G) at 0.5 and 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for the treatment of endocarditis caused by *S. aureus* S5.

netic parameters of i.v. administration of 1 and 4.5 mg of gentamicin per kg in humans, are shown in Table 1 and Fig. 1C and D.

In vivo efficacy studies in model of experimental endocarditis. The results of the different therapeutic regimens for experimental endocarditis caused by *S. aureus* S5 are shown in Table 3. After 24 h of treatment, bacterial counts were reduced in the vegetations of the animals treated with all the drug regimens compared to those in the control group ($P < 0.001$). Comparisons between the treated groups revealed that ceftriaxone administered alone was less effective than cloxacillin administered alone ($P < 0.01$). The combinations of gentamicin plus cloxacillin or ceftriaxone were significantly more effective than cloxacillin or ceftriaxone administered as single therapy ($P < 0.01$). Ceftriaxone at a dose that simulated H-L pharmacoki-

netics (ceftriaxone H-L) plus gentamicin at H-L 4.5 mg/kg, both administered once a day, was effective and displayed activity similar to that of the "gold standard," cloxacillin H-L plus gentamicin H-L 1 mg/kg three times a day ($P > 0.05$), and was more effective than cloxacillin or ceftriaxone alone ($P < 0.01$).

DISCUSSION

The purpose of the present study was to determine the efficacy of ceftriaxone plus gentamicin, both administered once a day as at doses that simulate H-L pharmacokinetics, compared to that of the standard treatment of cloxacillin plus gentamicin for the treatment of experimental endocarditis due to MSSA. Our results showed that the two combinations were

TABLE 3. Treatment of experimental endocarditis caused by *S. aureus* S5 with a H-L pharmacokinetic profiles of cloxacillin alone or in combination with gentamicin and H-L profiles of ceftriaxone alone or with gentamicin

Treatment group ^a	No. of rabbits that survived/total no. tested	Log ₁₀ CFU/g of vegetation ^b
Control	13/16	11.44 (11.09–11.78)
Cloxacillin	16/20	5.59 (4.93–6.25) ^{c,d}
Cloxacillin + gentamicin three times a day	15/18	3.27 (2.57–3.97) ^{c,e}
Cloxacillin + gentamicin once a day	12/14	2.61 (2.25–2.97) ^{c,d}
Ceftriaxone	14/17	7.01 (6.23–7.79) ^c
Ceftriaxone + gentamicin once a day	12/16	3.74 (2.88–4.61) ^{c,e}

^a The treatments consisted of cloxacillin at H-L 2 g every 4 h i.v., ceftriaxone at H-L 2 g every 24 i.v., gentamicin at H-L 1 mg/kg every 8 h, at and gentamicin at 4.5 mg/kg every 24.

^b Results are means (95% confidence intervals).

^c $P < 0.001$ versus control.

^d $P < 0.01$ versus ceftriaxone.

^e $P < 0.01$ versus cloxacillin and ceftriaxone.

equally effective and that the combinations were superior to treatment with cloxacillin or ceftriaxone alone. Cloxacillin was somewhat more effective than cephalosporin as single-drug therapy.

Narrow-spectrum cephalosporins are mainly active against gram-positive organisms and are equivalent to antistaphylococcal penicillins against MSSA in vitro (19). They have also been shown to have efficacy in the treatment of experimental MSSA endocarditis. The activities of cephalothin and cefazolin were similar to that of methicillin for the treatment of experimental staphylococcal endocarditis, despite the in vitro inactivation of cefazolin by staphylococcal beta-lactamase (4, 26). In contrast, the broad-spectrum cephalosporins are, in general, less active in vitro than nafcillin and cefazolin against MSSA (15). In the study of Dhawan et al. (5), who compared the activities of cefmenoxime, cefotaxime, latamoxef, and nafcillin in the treatment of experimental MSSA endocarditis, nafcillin showed an efficacy similar to that of latamoxef and better than those of cefmenoxime and cefotaxime. Steckelberg et al. (34) compared the efficacies of ceftiprome, cefazolin, cefuroxime, ceftriaxone, cefotaxime, ceftizoxime, cefoperazone, ceftazidime, and nafcillin in the treatment of experimental endocarditis due to MSSA. In vivo, nafcillin was the most active agent and was significantly more effective than ceftizoxime, cefotaxime, ceftriaxone, cefoperazone, cefuroxime, or cefazolin. Our results concur with those reported before. The outcome for the group treated with ceftriaxone was poorer than that for the group treated with cloxacillin alone. Ceftriaxone alone was less effective than cloxacillin for the treatment of experimental MSSA endocarditis.

Penicillin or an antistaphylococcal penicillin combined with an aminoglycoside has been shown to be effective in vitro and in animal models of MSSA endocarditis (3, 29, 30). There are few experimental data on the efficacy of ceftriaxone combined with an aminoglycoside for the treatment of staphylococcal endocarditis. Tallan et al. reported that ceftriaxone at doses of 7.5 mg/kg given intramuscularly (i.m.) combined with gentamicin at 1.5 mg/kg given i.m., both administered twice daily, was more active than 50 mg of cefazolin per kg administered i.m. alone thrice daily and was as active as cefazolin plus

gentamicin at 1 mg/kg given i.m. in three separate doses (B. M. Tallan, M. S. Rouse, N. K. Henry, J. M. Steckelberg, and W. R. Wilson, Program Abstr. 31st Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. 364, p. 159, 1991). The results from our experiments are in concordance with those in previous reports; the efficacy of combination therapy was clearly superior to the efficacy of beta-lactams administered alone. The aminoglycoside dosing interval is still under discussion. A meta-analysis conducted by Munckhof et al. (23) evaluated all the randomized clinical studies dealing with once-a-day administration of aminoglycosides. They reported that aminoglycosides can be given once daily rather than in divided doses for the treatment of human infections other than endocarditis without a loss of efficacy or increased toxicity, offering greater simplicity and potentially improved cost-effectiveness. Recently, the efficacy of gentamicin administered once a day instead of in three divided doses has been evaluated for the treatment of nonstaphylococcal experimental endocarditis (2, 8, 11, 13, 14, 20, 28, 32). To date, the efficacy of gentamicin administered once a day against experimental MSSA endocarditis has not been evaluated. Our results confirm the fact that the efficacy of gentamicin given once daily in combination with either cloxacillin or ceftriaxone was similar to that of the combination of cloxacillin with the gentamicin given in three divided doses.

Ceftriaxone and teicoplanin have long $t_{1/2}$ s (6 to 9 h), making once-daily administration practicable. The evaluation of their efficacies when they are combined with aminoglycosides in a single dose for the treatment of experimental endocarditis due to different microorganisms could lead to a therapeutic strategy that allows treatment of this infection on an outpatient basis. Although it is possible that oxacillin may be administered via a programmable infusion pump for home-based therapy, this approach is not always available, and the therapeutic regimens that may be administered once a day merit further examination. Our group demonstrated that the efficacy of teicoplanin combined with gentamicin, both given once a day, was as effective as the gold standard treatment for experimental enterococcal endocarditis, which uses ampicillin plus gentamicin in three divided doses (20). The results from a recent clinical study by Venditti et al. (36) provide further evidence that a single daily dose of teicoplanin plus gentamicin could be a good option for the home-based treatment of selected cases of enterococcal endocarditis. Six patients with enterococcal endocarditis were cured when they were treated with teicoplanin in combination with gentamicin or netilmicin once a day. In addition, the efficacy of once-daily administration of aminoglycosides associated with ceftriaxone has been documented for the treatment of viridans group streptococcal endocarditis in humans (9, 33). Two clinical studies demonstrated that a 2-week regimen of ceftriaxone plus gentamicin once daily or 4 weeks of treatment with ceftriaxone is efficacious and safe for the treatment of penicillin-susceptible streptococcal endocarditis and may allow partial or complete outpatient management for selected patients. No experimental studies have evaluated this issue with an animal model of staphylococcal endocarditis. Our studies showed that ceftriaxone at H-L 2 g plus gentamicin at H-L 4.5 mg/kg, both administered once a day, was effective and displayed activity similar to that of the gold standard, cloxacillin H-L plus gentamicin at H-L 1 mg/kg

three times a day, and was more effective than treatment with cloxacillin or ceftriaxone alone. There are few data on the efficacy of this combination in humans with staphylococcal endocarditis. Francioli (7) reported that a once-daily injection of ceftriaxone and gentamicin administered for 15 days was used successfully in Cameroon to treat 14 patients with endocarditis due to *S. aureus*.

Thus, the results obtained in our experiments suggest that the combination of ceftriaxone with gentamicin, both administered in a single daily dose, could be considered an alternative to the elective treatment and, in selected patients, after stabilization, as an outpatient therapeutic regimen in the treatment of MSSA endocarditis. However, further studies with animal models and humans are needed to confirm these data.

REFERENCES

- Hibbs, A. L., W. E. Dismukes, D. T. Durack, E. L. Kaplan, A. W. Karchmer, D. Kaye, S. B. Rafanolo, M. A. Sande, J. P. Sandford, C. Watanakmakorn, and W. R. Wilson. 1989. Antimicrobial treatment of infective endocarditis due to viridans streptococci, enterococci and staphylococci. *JAMA* 261:1471-1477.
- Bhatter M., U. Hukiger, J. Fontana, M. P. Glauser, and P. Francioli. 1993. Simulated human serum profiles of one daily dose of ceftriaxone in the treatment of experimental streptococcal endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:1971-1976.
- Campes, M. E., S. Rabinovitch, and I. M. Smith. 1974. Therapy of experimental staphylococcal infection with antibiotic combinations. *J. Lab. Clin. Med.* 83:241-248.
- Carrizosa, J., J. Santoni, and D. Kaye. 1978. Treatment of experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis: comparison of cephalothin, cefazolin, and methicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13:74-77.
- Dhawan, V. K., H. Thadepalli, M. K. Malar, M. Nayar, M. B. Bansal, and S. K. Chhab. 1984. Newer beta-lactam antibiotics in the treatment of experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis. *J. Antimicrob. Chemother.* 14: 165-169.
- Espersen, F., and N. Frimodt-Møller. 1986. *Staphylococcus aureus* endocarditis. A review of 119 cases. *Arch. Intern. Med.* 146:1118-1121.
- Francioli, P. B. 1993. Ceftriaxone and outpatient treatment of infective endocarditis. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 7:97-115.
- Francioli, P. B., and M. P. Glauser. 1993. Synergistic activity of ceftriaxone combined with netilmicin administered once daily for treatment of experimental streptococcal endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:207-212.
- Francioli, P. B., W. Bush, D. Staniforth, and the International Infective Endocarditis Study Group. 1995. Treatment of streptococcal endocarditis with a single daily dose of ceftriaxone and netilmicin for 14 days: a prospective multicenter study. *Clin. Infect. Dis.* 21:1406-1410.
- Garrison, P. K., and L. R. Freedman. 1970. Experimental endocarditis. I. Staphylococcal endocarditis in rabbits resulting from placement of a polyethylene catheter in right side of the heart. *Yale J. Biol. Med.* 42:394-410.
- Gavaldà, J., A. Pabissa, B. Almirante, M. Laguna, E. Crespo, L. Peña, and F. Fernández. 1995. Effect of gentamicin dosing interval on therapy of viridans streptococcal experimental endocarditis with penicillin plus gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:2098-2103.
- Gavaldà, J., C. Torres, C. Tenorio, P. Lopez, M. Zanoguza, J. A. Capdevila, B. Almirante, F. Ruiz, N. Borrell, C. Pigrau, F. Bagters, and A. Pabissa. 1999. Efficacy of ampicillin plus ceftriaxone in treatment of experimental endocarditis due to *Enterococcus faecalis* strains highly resistant to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:639-646.
- Gavaldà, J., P. J. Cardona, B. Almirante, J. A. Capdevila, M. Laguna, L. Peña, E. Crespo, C. Pigrau, and A. Pabissa. 1996. Treatment of experimental endocarditis due to *Enterococcus faecalis* using once-daily dosing regimen of gentamicin plus simulated profiles of ampicillin in human serum. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:173-178.
- Houtman, H. H., D. P. Stokes, and M. J. Rybak. 2000. Pharmacodynamics of vancomycin and ampicillin alone and in combination with gentamicin once daily or thrice daily against *Enterococcus faecalis* in an in vitro infection model. *J. Antimicrob. Chemother.* 46:79-86.
- Karchmer, A. W. 1995. Cephalosporins, p. 247-264. In G. L. Mandell, J. E. Bennett, and R. Dolin (ed.), *Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases*, 4th ed. Churchill Livingstone Inc., New York, N.Y.
- Knapp, C., and J. A. Moody. 1992. Tests to assess bactericidal activity. In H. D. Tenberg (ed.), *Clinical microbiology procedures handbook*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Leggett, J. E., B. Fautin, S. Ebert, K. Totsuka, W. Calame, H. Mattie, and W. A. Craig. 1989. Comparative antibiotic dose-effect relations at several dosing intervals in murine pneumonitis and thigh-infection models. *J. Infect. Dis.* 159:281-292.
- Leggett, J. E., S. Ebert, B. Fautin, and W. A. Craig. 1991. Comparative dose-effect relations at several dosing intervals or beta-lactam, aminoglycoside and quinolone antibiotics against gram-negative bacilli in murine thigh-infection and pneumonitis models. *Scand. J. Infect. Dis.* 74(Suppl):179-184.
- Livertmore, D. M., and J. D. Williams. 1996. β -Lactams: mode of action and mechanisms of bacterial resistance, p. 502-578. In V. Lorian (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*, 4th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
- López, P., J. Gavaldà, M. T. Martín, B. Almirante, X. Gomis, C. Arzuaje, N. Borrell, L. Peña, V. Falco, C. Pigrau, and A. Pabissa. 2001. Efficacy of teicoplanin-gentamicin given once a day on the basis of pharmacokinetics in humans for treatment of enterococcal experimental endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:1387-1393.
- McCormick, A. A., D. M. Ryan, and P. Acrot. 1984. Comparison of cefazidime, cefuroxime and methicillin in the treatment of *Staphylococcus aureus* endocarditis in rabbits. *J. Antimicrob. Chemother.* 14:373-377.
- Mensa, J., J. M. Gatell, M. T. Jiménez de Arma, G. Prats, and A. Domínguez-Gil. 1994. Antimicrobianos, p. 2-138. In J. Mensa, J. M. Gatell, M. T. Jiménez de Arma, G. Prats, and A. Domínguez-Gil (ed.), *Guía de práctica terapéutica antimicrobiana*, 4th ed. Masson, Barcelona, Spain.
- Murkhdof, W. J., M. L. Grayson, and J. D. Turnidge. 1996. A meta-analysis of studies on the safety and efficacy of aminoglycosides given either once daily or as divided doses. *J. Antimicrob. Chemother.* 37:645-663.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests on bacteria that grow aerobically, 4th ed. Approved standard M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- Patel, J. H., S. Chen, M. Parvonnat, M. R. Hackman, M. A. Brooks, J. Koulikoff, and S. A. Kaplan. 1981. Pharmacokinetics of ceftriaxone in humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* 20:634-641.
- Rause, M. S., B. M. Tallan, N. K. Henry, J. M. Steckelberg, and W. R. Wilson. 1992. Animal models as predictors of outcome of therapy with broad spectrum cephalosporins. *J. Antimicrob. Chemother.* 29(Suppl. A):39-45.
- Sahn, D. F., and C. Torres. 1988. Effects of medium and inoculum variations on screening for high-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus faecalis*. *J. Clin. Microbiol.* 26:250-256.
- Saleh-Mighty, A. A. C. Grunert, J. M. Vallis, M. Maffei-Jolly, C. Derime, and C. Carbon. 1992. Optimal aminoglycoside dosing regimen for penicillin-tobramycin synergism in experimental *Stenococcus adenois* endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:2403-2407.
- Sande, M. A., and K. B. Courtney. 1976. Nafcillin-gentamicin synergism in experimental staphylococcal endocarditis. *J. Lab. Clin. Med.* 88:118-124.
- Sande, M. A., and M. L. Johnson. 1975. Antimicrobial therapy of experimental endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 131:367-375.
- Schontag, J. J., W. J. Jusko, J. W. Vance, T. J. Conbo, E. Abrutyn, M. Delattre, and L. M. Gerbracht. 1977. Gentamicin disposition and tissue accumulation on multiple dosing. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 5:559-577.
- Schwank, S., and J. Blasser. 1996. Once versus thrice-daily netilmicin combined with amoxicillin, penicillin, or vancomycin against *Enterococcus faecalis* in a pharmacodynamic in vitro model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:2258-2261.
- Sexton, D. J., M. J. Tenenbaum, W. R. Wilson, J. M. Steckelberg, A. D. Tice, D. Gilbert, W. Dismukes, R. H. Drew, D. T. Durack, and the Endocarditis Treatment Consortium Group. 1998. Ceftriaxone once daily for four weeks compared with ceftriaxone plus gentamicin once daily for two weeks for treatment of endocarditis due to penicillin-susceptible streptococci. *Clin. Infect. Dis.* 27:1470-1474.
- Steckelberg, J. M., M. S. Rause, B. M. Tallan, D. R. Osmon, N. K. Henry, and W. R. Wilson. 1993. Relative efficacies of broad-spectrum cephalosporins for treatment of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* experimental infective endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:554-558.
- Tornos, P., B. Almirante, S. Mirabet, G. Perreny, A. Pabissa, and J. Seler Seler. 1999. Infective endocarditis due to *Staphylococcus aureus*: deleterious effect of anticoagulant therapy. *Arch. Intern. Med.* 159:473-475.
- Venturi, M., A. Taras, A. Capone, M. Gallo, F. Monchetti, P. Martino, and P. Serra. 1997. Teicoplanin in the treatment of enterococcal endocarditis: clinical and microbiological study. *J. Antimicrob. Chemother.* 40:449-452.
- Vogelman, B., S. Gulimudsson, J. Leggett, J. Turnidge, S. Ebert, and W. A. Craig. 1988. Correlation of antimicrobial pharmacokinetic parameters with therapeutic efficacy in an animal model. *J. Infect. Dis.* 156:831-847.
- Wilson, W. R., A. W. Karchmer, A. S. Dajani, K. A. Tamberi, A. Bayer, D. Kaye, A. L. Hibbs, P. Ferrieri, S. T. Shulman, and D. T. Durack. 1995. Antibiotic treatment of adults with infective endocarditis due to streptococci, enterococci, staphylococci and HACEK microorganisms. *JAMA* 274:1706-1713.

Addendum

Durante el período de preparación de elaboración de esta tesis, nuestro grupo ha publicado un nuevo estudio, que se ha considerado interesante incluir en este proyecto, ya que aporta nuevas perspectivas y completa la consecución de los objetivos que se pretendían alcanzar en esta serie de estudios.

5. Estudio 4

Efficacy of ampicillin combined with ceftriaxone and gentamicin in the treatment of experimental endocarditis due to *Enterococcus faecalis* with no high-level resistance to aminoglycosides.

Joan Gavaldà, Pedro López, M. Teresa Martín, Xavier Gomis, José Luis Ramírez, Oscar Len, Dolors Rodríguez, Manuel Crespo, Isabel Ruiz y Albert Pahissa.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2003. 52: 514–517.

5.1. Objetivos concretos del Estudio 4

1. Estudiar la eficacia de la combinación de ampicilina más ceftriaxona en el tratamiento de la endocarditis experimental en conejos causada por *E. faecalis* sin resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos, administrando los antimicrobianos de forma que sus concentraciones séricas simulen los parámetros farmacocinéticos que se observan en humanos.
2. Evaluar si la adición de gentamicina a la combinación de ampicilina más ceftriaxona resulta en una mejor eficacia en el tratamiento de la endocarditis experimental causada por *E. faecalis* sin resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos en el modelo animal en conejos.

Efficacy of ampicillin combined with ceftriaxone and gentamicin in the treatment of experimental endocarditis due to *Enterococcus faecalis* with no high-level resistance to aminoglycosides

Joan Gavalda^{*}, Pedro López Onrubia, María Teresa Martín Gómez, Xavier Gomis, José Luis Ramírez, Oscar Len, Dolors Rodríguez, Manuel Crespo, Isabel Ruíz and Albert Pahissa

Infectious Diseases Research Laboratory, Infectious Diseases Division, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Avda. Vall d'Hebron, 119–129, 08035 Barcelona, Spain

Received 24 March 2003; returned 25 April 2003; revised 4 June 2003; accepted 6 June 2003

Objective: This study tests the usefulness of ceftriaxone combined with ampicillin as an alternative to ampicillin plus gentamicin for the treatment of experimental endocarditis due to *Enterococcus faecalis* without high-level resistance to aminoglycosides. It also determines whether adding ceftriaxone to ampicillin and gentamicin increases the effectiveness against experimental enterococcal endocarditis resulting from *E. faecalis*.

Methods: Animals with catheter-induced endocarditis were infected intravenously with 10^8 cfu of the EF91 strain of *E. faecalis* and were treated for 3 days with ampicillin 2 g every 4 h administered as 'human-like' (H-L) pharmacokinetics, plus gentamicin 1 mg/kg every 8 h H-L, or ceftriaxone 2 g every 12 h H-L alone or combined with gentamicin 6 mg/kg every 24 h administered subcutaneously.

Results: The results of therapy for experimental endocarditis resulting from EF91 showed that the combination of ampicillin plus ceftriaxone was as effective as ampicillin plus gentamicin. The triple combination did not improve on the overall efficacies of the two-drug combinations.

Conclusions: Because of its lower nephrotoxicity, ampicillin plus ceftriaxone may be a useful alternative therapy for *E. faecalis* endocarditis in selected patients.

Keywords: bacteria, intravascular infections, animal models, antibiotic combinations

Introduction

The combination of penicillin or ampicillin plus an aminoglycoside for 4–6 weeks is recommended for the treatment of enterococcal endocarditis.¹ Nevertheless, prolonged therapy with aminoglycosides carries a risk of nephro- and oto-toxicity, particularly in the elderly,² the population most frequently succumbing to this infection. In previous work, our group demonstrated the efficacy of ampicillin plus ceftriaxone for the treatment of experimental endocarditis resulting from *Enterococcus faecalis* strains highly resistant to aminoglycosides (HLRAg).² This combination could be an attractive therapeutic alternative, having potentially lower toxicity than the standard therapy for *E. faecalis* endocarditis. The aims of the present study were to evaluate the efficacy of ampicillin plus ceftriaxone in the treatment of experimental endocarditis due to non-HLRAg *E. faecalis*, and to test the effectiveness of a triple combination,

adding ceftriaxone to ampicillin and gentamicin, to see whether *in vivo* efficacy was increased.

Materials and methods

The study strain was *E. faecalis* EF91, recovered from a patient with endocarditis. MICs/MBCs were determined using Mueller–Hinton broth and a standard microdilution method following NCCLS guidelines.³ Qualitative estimation of the synergy between ampicillin, ceftriaxone and gentamicin (bacteriostatic interaction) was obtained using a disc diffusion method (ampicillin 10 µg; gentamicin 30 µg; ceftriaxone 30 µg).⁴ In addition, time–kill synergy studies were performed in quintuplicate, following accepted methods, in Mueller–Hinton broth, using an inoculum of 10^7 cfu/ml, and an ampicillin concentration of 1 mg/L, either alone or in combination with gentamicin (final concentrations: 1, 3 and 10 mg/L) or ceftriaxone (final concentrations: 10, 20 and 40 mg/L).⁴

^{*}Corresponding author. Tel: +34-93-4894033; Fax: +34-93-2746057; E-mail: gavalda@hg.vhebron.es

Antibiotic combinations in experimental endocarditis

Table 1. Pharmacokinetic parameters of ampicillin, gentamicin and ceftriaxone iv in rabbit, human and rabbit H-L.

	$t_{1/2}$ (h)	k_{el} (d ⁻¹)	AUC _{0-∞} (mg·h/L)
Ampicillin 2 g iv ^a			
rabbit ^b	0.3 ± 0.3	2.4 ± 0.29	38.19
human ^c	1.1	0.63	127.8
rabbit H-L ^d	0.99 ± 0.08	0.71 ± 0.05	116.7 ± 31.83
Gentamicin 1 mg/kg iv			
rabbit	1.09 ± 0.3	0.64 ± 0.3	9.6
human	2.54	0.27	18
rabbit H-L	2.5 ± 0.37	0.27 ± 0.034	15.8 ± 1.24
Ceftriaxone 2 g iv			
rabbit	1.66 ± 0.15	0.4 ± 0.04	260.72
human	6.92	0.1	1506.3
rabbit H-L	7.21 ± 0.19	0.09 ± 0.002	1819 ± 82.72

^aThe pharmacokinetic parameters were estimated on the basis of an open one-compartment model.

^b $t_{1/2}$ and k_{el} data are for healthy rabbits treated with ampicillin 100 mg/kg, gentamicin 6 mg/kg and ceftriaxone 50 mg/kg iv. The AUC_{0-∞} was calculated from the data for an ideal profile obtained with a C_0 of 80 mg/L for ampicillin, a $C_{0.5}$ of 5 mg/L for gentamicin, a C_0 of 256.8 mg/L for ceftriaxone and the k_{el} of each drug in rabbits.

^c $t_{1/2}$, $t_{1/2}$ and AUC_{0-∞} were obtained from an ideal profile in human serum of ampicillin 2 g, gentamicin 1 mg/kg and ceftriaxone 2 g.

^dData for H-L pharmacokinetics of ampicillin 2 g, gentamicin 1 mg/kg and ceftriaxone 2 g.

Induction of aortic endocarditis, and insertion of a catheter into the inferior vena cava to administer ampicillin, gentamicin and ceftriaxone treatment in New Zealand rabbits (weight: 2–2.1 kg) has been described previously.^{5,6} Forty-eight hours after inducing infection with a 1 mL inoculum containing 10⁸ cfu of EP91 strain, a 3 day treatment protocol was started in infected rabbits, randomized into the following treatment groups: control, without treatment; ampicillin 2 g every 4 h, using human-like (H-L) pharmacokinetics iv; ampicillin 2 g every 4 h H-L iv + gentamicin 1 mg/kg every 8 h H-L iv; ampicillin 2 g every 4 h H-L iv + ceftriaxone 2 g every 12 h H-L iv; and ampicillin 2 g every 4 h H-L iv + ceftriaxone 2 g every 12 h H-L iv + gentamicin 6 mg/kg every 24 h subcutaneously (sc). Intravenous drugs were administered using a computer-controlled infusion pump system (infusion pump, Alice King, Hawthorne, CA, USA) that reproduces human serum pharmacokinetics in rabbits. The pharmacokinetic data for ampicillin, ceftriaxone and gentamicin administered iv to mimic human pharmacokinetics have been published previously,^{2,5,6} and are summarized in Table 1. The pharmacokinetic parameters of gentamicin 6 mg/kg every 24 h sc have also been published.⁵ The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of Vall d'Hebron Hospitals and the Agricultura, Ramaderia i Pesca Department of the Generalitat de Catalunya.

Six hours after completing the final antibiotic infusion, the animals were killed and colony counts in the vegetations determined, as previously described.^{5,6} Bacterial concentrations in vegetations from the various treatment groups were compared using one-way analysis of variance. Each treatment group was compared with the control group and with each of the other treatment groups using Scheffé's test. *P* values ≤ 0.05 were considered significant.

Results and discussion

The MICs of ampicillin, gentamicin and ceftriaxone were 0.5, 32 and 64 mg/L, respectively; MBCs were 32, 64 and >256 mg/L.

Synergistic and bactericidal effects were obtained with combinations of ampicillin and gentamicin (at 1, 3 or 10 mg/L), and ampicillin and ceftriaxone (at 10, 20 or 40 mg/L) after 4 and 24 h of incubation. Susceptibility studies with agar diffusion techniques showed synergy between ampicillin, gentamicin and ceftriaxone.

Results of therapy for EP91 experimental endocarditis are shown in Table 2. After 3 days of treatment, bacterial counts were reduced in vegetations of the treated animals compared with the control group (*P* < 0.05). Combinations of ampicillin with gentamicin or ceftriaxone were more effective than ampicillin alone (*P* < 0.05). Treatment with ampicillin plus ceftriaxone was as effective as ampicillin plus gentamicin (*P* not significant). Ampicillin combined with gentamicin and ceftriaxone was not superior to ampicillin plus gentamicin or ampicillin plus ceftriaxone (*P* not significant).

The objectives of this work were: first, to test the usefulness of ceftriaxone combined with ampicillin as an alternative to the gold standard, ampicillin plus gentamicin, for the treatment of endocarditis caused by an *E. faecalis* strain with no resistance to β-lactams or aminoglycosides; and second, to determine whether efficacy against this disease increases with use of a triple combination: ceftriaxone, ampicillin and gentamicin. Our results showed that ampicillin plus ceftriaxone was as effective as the treatment of choice (ampicillin plus gentamicin) for experimental endocarditis. The triple combination did not improve on the overall efficacies of the two-drug combinations.

The present *in vitro* studies demonstrated synergistic activity between ampicillin and ceftriaxone against EP91. A similar synergistic *in vitro* effect was detected by Mainardi *et al.*, with amoxicillin and cefotaxime.⁷ Nevertheless, this combination did not show *in vivo* efficacy in the treatment of experimental endocarditis resulting from two *E. faecalis* strains, one with and one without high-level resistance to aminoglycosides. The authors concluded that *in vivo* efficacy was

J. Gavaldà *et al.***Table 2.** Results of the therapeutic groups of rabbit experimental endocarditis due to the *Enterococcus faecalis* EP91 strain, using H-L pharmacokinetics

Treatment group	n survivors/n total	EP91 [\log_{10} cfu per g vegetation (mean \pm S.D.)]
Control	15/18	9.2 \pm 0.4
Ampicillin 2 g/4 h H-L iv	13/16	6.9 \pm 0.9 ^a
Ampicillin 2 g/4 h H-L iv + gentamicin 1 mg/kg/8 h H-L iv	11/14	5.7 \pm 1.1 ^{a,b}
Ampicillin 2 g/4 h H-L iv + ceftriaxone 2 g/12 h H-L iv	11/15	5.2 \pm 0.5 ^{a,b}
Ampicillin 2 g/4 h H-L iv + ceftriaxone 2 g/12 h H-L iv + gentamicin 6 mg/kg/24 h sc	13/15	5.1 \pm 1.1 ^{a,b}

^aAll treatment groups showed a significant reduction of the \log_{10} cfu/g ($P < 0.05$) with respect to the control group.

^bTreatment groups with combination drugs showed a significant reduction of the \log_{10} cfu/g ($P < 0.05$) with respect to the group treated with ampicillin H-L alone.

absent because amoxicillin alone was bactericidal *in vivo* and the period of time during which both antibiotics were present simultaneously and at adequate concentrations to obtain *in vivo* synergy, was limited.⁸

In contrast, our *in vivo* results show that the combination of ampicillin plus ceftriaxone was as effective as ampicillin plus gentamicin administered in three daily doses. The efficacy of the combination of ampicillin plus ceftriaxone was comparable to the efficacy we found for ceftriaxone 2 g every 12 h H-L combined with ampicillin 2 g every 4 h H-L in the treatment of HLRAg *E. faecalis* experimental endocarditis.² The discrepancies between our results and those reported by Join-Lambert *et al.*⁸ can be attributed to dissimilarities among the experimental variables. The β -lactams in the two studies were different and might have had dissimilar activities against *E. faecalis*, and our experimental model simulated human kinetics of ampicillin 2 g every 4 h iv and ceftriaxone 2 g every 12 h iv. The relationship between the shape of the β -lactam AUCs and their antimicrobial activity has been established; thus, simulation of human serum pharmacokinetics comes closer to the human clinical situation.

The combination of ampicillin plus ceftriaxone broadens the range of alternative therapies for the treatment of enterococcal endocarditis. Toxicity resulting from aminoglycosides depends mainly on the duration of treatment, the age of the patient and total amount administered.¹ Since enterococcal endocarditis appears generally in older patients, and age is associated with a higher risk of nephrotoxicity from aminoglycosides,¹ these patients may benefit from less-toxic therapy. Our group recently reported our experience with 20 episodes of enterococcal endocarditis treated with ampicillin combined with ceftriaxone or cefotaxime, including 13 episodes caused by strains with HLRAg and seven resulting from non-resistant strains.⁹ Sixteen patients received at least 1 month of cephalosporin therapy and all were cured; only three patients underwent surgery and none developed renal failure. We concluded that the combination of ampicillin plus ceftriaxone or cefotaxime was safe and effective in the treatment of enterococcal endocarditis caused by strains with and without HLRAg.

Enterococcal endocarditis still lacks a completely satisfactory treatment. The standard therapy, ampicillin plus gentamicin, does not cure all cases and its prolonged duration poses a risk to patients.

Effort must be made to find combinations that can cure a higher percentage of cases, and efficacious treatments of a shorter duration. In the present study, the efficacy obtained with the addition of ceftriaxone to the combination of ampicillin plus gentamicin was similar to that of ampicillin combined with gentamicin or ceftriaxone. The triple combination did not improve on the overall efficacies of the two-drug combinations. There is little experience with triple-drug combinations for the treatment of enterococcal experimental endocarditis. Caron *et al.*¹⁰ found that combined penicillin, gentamicin and vancomycin was effective for experimental endocarditis caused by *E. faecium* highly-resistant to penicillin and glycopeptides, whereas combined penicillin or vancomycin plus gentamicin was not effective. These authors detected the emergence of a subpopulation resistant to the combination of penicillin plus vancomycin, and this reduced the utility of this combination.

In conclusion, the efficacy of ampicillin and ceftriaxone combined in our experiments was comparable to that of ampicillin plus gentamicin. Since there is a relatively lower risk of nephrotoxicity with ampicillin plus ceftriaxone, this combination could be valuable for treating enterococcal endocarditis resulting from non-HLRAg strains in elderly patients, or in those with previous renal disease or signs of toxicity. Further studies are needed to establish the true efficacy of this therapeutic approach in humans with enterococcal endocarditis.

Acknowledgements

We thank Celine Cavallo for assistance with our written English. This work was supported in part by Fondo Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FISS grant no. 98/0426).

References

- Scheidt, W. M. & Sands, M. A. (1995). Endocarditis and intravascular infections. In *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 4th edn (Mandell, G. L., Bennett, J. E. & Dolin, R., Eds), pp. 740–83. Churchill-Livingstone, New York, NY, USA.
- Gavaldà, J., Torres, C., Tenorio, C. *et al.* (1999). Efficacy of ampicillin plus ceftriaxone in treatment of experimental endocarditis due to

Antibiotic combinations in experimental endocarditis

Enterococcus faecalis strains highly resistant to aminoglycosides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 639–46.

3. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1997). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically—Fourth Edition: Approved Standard M7-A4*. NCCLS, Wayne, PA, USA.

4. Eliopoulos, G. M. & Moellering, R. C. (1996). Antimicrobial combinations. In *Antibiotics in Laboratory Medicine* (Lorian, V. Ed.), pp. 390–96. Williams & Wilkins, Baltimore, MA, USA.

5. Gavaldà, J., Cardona, P. J., Capdevila, J. A. et al. (1996). Treatment of experimental endocarditis due to *Enterococcus faecalis* using a once-daily dosing regimen of gentamicin plus simulated profiles of ampicillin in human serum. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**, 173–8.

6. López, P., Gavaldà, J., Martín, M. T. et al. (2001). Efficacy of teicoplanin-gentamicin given once a day on the basis of pharmacokinetics in humans for treatment of enterococcal experimental endocarditis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**, 1387–93.

7. Mainardi, J. L., Gutmann, L., Acar, J. F. et al. (1995). Synergistic effect of amoxicillin and cefotaxime against *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**, 1984–7.

8. Join-Lambert, O., Mainardi, J. L., Cuvelier, C. et al. (1998). Critical importance of in vivo amoxicillin and cefotaxime concentrations for synergy in treatment of experimental *Enterococcus faecalis* endocarditis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**, 468–70.

9. Gavaldà, J., Miró, J. M., Torres, C. et al. Efficacy of ampicillin (A) plus ceftriaxone (Ctr) or cefotaxime (Cx) in the treatment of endocarditis due to *Enterococcus faecalis*. In *Programs and Abstracts of the Forty-first Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Chicago, IL, 2001. Abstract 1342, p. 466. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.

10. Caron, F., Lemeland, J. F., Humbert, G. et al. (1993). Triple combination penicillin-vancomycin-gentamicin for experimental endocarditis caused by a highly penicillin- and glycopeptide-resistant isolate of *Enterococcus faecium*. *Journal of Infectious Diseases* **168**, 681–6.

3. RESULTADOS

1. Resultados Estudio 1:

Efficacy of Ampicillin plus Ceftriaxone in Treatment of Experimental Endocarditis Due to *Enterococcus faecalis* Strains Highly Resistant to Aminoglycosides.

1.1. Estudios de sensibilidad *in vitro*.

Se determinaron las CIM de ampicilina y ceftriaxona en 10 cepas de *E. faecalis* aisladas de muestras clínicas, mediante el método de dilución en agar (véase Tabla 2 del Estudio 1). Todas las cepas resultaron sensibles a ampicilina (CIM de 1-4 $\mu\text{g/mL}$) y resistentes a ceftriaxona (CIM, $\geq 256 \mu\text{g/mL}$). La actividad bactericida de las diferentes concentraciones de ampicilina a las 24 h de incubación frente a las 10 cepas estudiadas se muestran en la Tabla 3 del Estudio 1. La eficacia de concentraciones intermedias de ampicilina en la reducción del número de células viables fue superior a la eficacia conseguida con concentraciones superiores. Estos resultados se repitieron de forma consistente para ocho cepas en tres repeticiones de los experimentos.

Los efectos bactericidas más elevados se obtuvieron a concentraciones que estaban entre 2 a 8 veces por encima de la CIM. La ventana de actividad bactericida de la ampicilina (reducción de bacterias viables superior al 99,9%) en las diferentes cepas se correspondió a concentraciones entre 2 a 16 $\mu\text{g/mL}$. El efecto bactericida fue indetectable a concentraciones de ampicilina entre 4 a 32 veces la CIM (8 a 32 $\mu\text{g/mL}$). Todas las cepas de *E. faecalis* mostraron alto nivel de resistencia a gentamicina, tobramicina, kanamicina y estreptomycin, con CIMs $\geq 2,000 \mu\text{g/mL}$. La presencia de los genes *aph(2'')*-*aac(6')* y el *aph(3')*-III se confirmó en todas las cepas mediante el método de la PCR.

1.2. Estudios de sinergia.

Una reducción de 1 a 4 diluciones en las CIMs se obtuvo cuando la ampicilina se combinaba con una concentración subinhibitoria de 4 $\mu\text{g/mL}$ de ceftriaxona. Este efecto potenciado también se observó en las diez cepas estudiadas mediante el método del doble disco (véase Tabla 2 del Estudio 1). Cuando las CIMs se

determinaron por el método de microdilución, las CIMs de ampicilina mostraron una dilución inferior (véase Tabla 3 del estudio 1).

Los resultados de los estudios de letalidad realizados con ampicilina a concentraciones de 1 o 2 $\mu\text{g/mL}$, sola o en combinación con 5, 10, 20, 40, y 60 $\mu\text{g/mL}$ de ceftriaxona mostraron que tras 4 h de contacto, la ampicilina sola produjo un efecto bacteriostático (incremento con respecto al inóculo inicial $\leq 0,3 \log$) en 4 cepas de las 10 estudiadas, con concentraciones de 1 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina y en 9 de las diez cepas con 2 $\mu\text{g/mL}$; resultados similares se obtuvieron tras 24 h de incubación: 3 de 10 y 9 de 10, respectivamente. A concentraciones entre 5 a 60 $\mu\text{g/mL}$, la ceftriaxona sola no alteró significativamente el inóculo bacteriano inicial a 4 o 24 h. A las 24 h de incubación, los estudios mostraron una reducción $\geq 2 \log_{10}$ de las UFC/mL entre ceftriaxona más ampicilina y ampicilina sola en todas las cepas de *E. faecalis* estudiadas. A las 24 h, la mayoría de las concentraciones combinadas (70%) de ampicilina y ceftriaxona produjeron este efecto, y en un 36% de las combinaciones se observó efecto bactericida (una mortalidad respecto al inóculo inicial $\geq 3 \log_{10}$). Se ha de resaltar que tras 24 h de incubación la ceftriaxona sola no afectó a los recuentos de los enterococos, aunque influyó ligeramente en la pendiente del crecimiento bacteriano en 8 cepas.

En los casos estudiados, es evidente que los estrictos requisitos de definición de sinergia no se cumplieron, aunque los resultados sugieren una situación muy aproximada a la sinergia verdadera. Esta fuerte cooperación antimicrobiana entre los dos antibióticos se obtuvo en 7 cepas con la combinación de 2 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina más 10 $\mu\text{g/mL}$ de ceftriaxona, y en seis cepas con 5 $\mu\text{g/mL}$ de ceftriaxona. Tras solo 4 horas de incubación, un tercio de las combinaciones de ampicilina con ceftriaxona ocasionaron unas reducciones significativas de los recuentos bacterianos ($\geq 2 \log_{10}$ con respecto a ampicilina sola o al inóculo inicial) en 9 de las 10 cepas estudiadas.

1.3. Estudios farmacocinéticos.

Los datos farmacocinéticos de ceftriaxona en conejos que se usaron en el modelo matemático, determinados en 8 conejos sanos a los que se les administró una dosis de 50 mg/kg, en un bolo i.v., fueron los siguientes (media \pm DE): α_c , $3,7 \pm 0,41 \text{ h}^{-1}$;

β_c , $0,42 \pm 0,07 \text{ h}^{-1}$; k_{21c} , $1,53 \pm 0,3 \text{ h}^{-1}$; k_{13c} , $1,07 \pm 0,3 \text{ h}^{-1}$; y V_c , $0,16 \pm 0,01 \text{ l/kg}$. El perfil producido por la inyección de 2 g de ceftriaxona i.v., en el suero humano se simuló en los conejos mediante el sistema de bombas de perfusión controladas por ordenador (véase Figura 1B del Estudio 1). Esto resultó en unos niveles de pico y valle de ceftriaxona en el suero de los conejos (media \pm DE) de $242,7 \pm 17,6 \text{ }\mu\text{g/mL}$ los 15 minutos y de $21,6 \pm 2,9 \text{ }\mu\text{g/mL}$ a las 24 h, respectivamente (véase Figura 1B del estudio 1). Los parámetros farmacocinéticos obtenidos del modelo humanizado fueron similares a los detectados tras la administración de 2 g de ceftriaxona por vía i.v., en los humanos (véase la Tabla 5 del Estudio 1). Se llevaron a cabo estudios farmacocinéticos de ampicilina y ceftriaxona tras seis inyecciones repetidas de ampicilina y cuatro de ceftriaxona en conejos sanos y se comprobó que no existieron diferencias significativas respecto a los resultados aquí presentados (véase Figura 1 del Estudio 1).

1.4.Tratamiento de la endocarditis experimental.

Los resultados de los estudios de eficacia terapéutica de la endocarditis experimental originada por la cepa V48 de *E. faecalis* se muestran en la Tabla 6 del Estudio 1. A los 3 días de tratamiento, los recuentos bacterianos residuales en las vegetaciones cardíacas de los animales tratados fueron significativamente inferiores a los encontrados en los animales de control ($P < 0,0001$). Las comparaciones entre los grupos de tratamiento del número de bacterias presentes en las vegetaciones cardíacas mostraron que la combinación de ampicilina con ceftriaxona fue más eficaz que ampicilina sola de forma significativa ($P < 0,001$). La media del \log_{10} de UFC/g de vegetación en el grupo que recibió ampicilina con ceftriaxona presentó una reducción de 6,3 con respecto a la detectada en el grupo de control y de 3,7 con respecto a la media del grupo de ampicilina sola. De manera similar, el tamaño de las vegetaciones de los animales tratados con la combinación fue significativamente inferior al encontrado en los animales del grupo de ampicilina sola ($P = 0,0001$). En ningún animal se llegaron a esterilizar las vegetaciones. En los animales infectados con la cepa V45 de *E. faecalis* V45, el tratamiento con ampicilina más ceftriaxona fue incluso más efectivo (véase la Tabla 6 del Estudio 1). La ceftriaxona más ampicilina fue más eficaz en la reducción de los recuentos de enterococos de las vegetaciones que la ampicilina sola ($P < 0,0001$). Además, ningún animal del grupo tratado con

ampicilina sola presentó esterilización de las vegetaciones, mientras que con el tratamiento de ampicilina más ceftriaxona se consiguió la esterilización de las válvulas infectadas en 8 de 17 animales (47%) ($P < 0,001$). Con la intención de estudiar el posible efecto de arrastre (“carryover”) de los antibióticos, se realizó un bioensayo utilizando *Micrococcus* como el microorganismo testigo, y no se detectaron trazas de ampicilina o ceftriaxona. Por lo tanto, es improbable que se hubiera producido inhibición del crecimiento de *E. faecalis* (V45 o V48) por posibles trazas de ampicilina y ceftriaxona a las 6 h de finalizar la infusión, ya que fueron incapaces de inhibir el crecimiento de *M. luteus*. Además, teniendo en cuenta que la concentración valle de ampicilina fue de 4 $\mu\text{g/mL}$ y la concentración sérica en el valle de ceftriaxona fue de 30 $\mu\text{g/mL}$, y las k_{el} de ampicilina y ceftriaxona fueron de 2,4 y de 0,4 h^{-1} , respectivamente a las 6 h de terminada la infusión de los antibióticos, las concentraciones en el suero de los animales en el momento del sacrificio corresponderían a 0,000002 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina y de 2 $\mu\text{g/mL}$ de ceftriaxona, niveles que no son suficientes para inhibir el crecimiento de *E. faecalis*.

2. Resultados Estudio 2.

Efficacy of Teicoplanin-Gentamicin Given Once a Day on the Basis of Pharmacokinetics in Humans for Treatment of Enterococcal Experimental Endocarditis

2.1. Estudios *in vitro*.

Las CIM y CBM de ampicilina, gentamicina y teicoplanina para la cepa de *E. faecalis* EF91 fueron de 0,5 y 32, 16 y 32, y de 0,5 y 1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Los intervalos de CIM y CBM de ampicilina, gentamicina y teicoplanina de las otras cepas estudiadas fueron de 0,5-1 y 8-32, 8-16 y 16-64, y de 0,25-0,5 y 1-4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Todas las cepas fueron sensibles a ampicilina y teicoplanina y ninguna de las cepas estudiadas mostró resistencia de alto nivel a gentamicina.

Los resultados de los estudios de letalidad se muestran en la Tabla 2 del Estudio 2. Teicoplanina o gentamicina, a las concentraciones estudiadas y en solitario, solo mostraron efecto bacteriostático (los recuentos de bacterias viables no experimentaron una reducción $\geq 3 \log_{10}$ tras 24 h de incubación). En contraste, las combinaciones de teicoplanina a concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ más gentamicina a concentraciones de 1, 3 o 10 $\mu\text{g/mL}$ mostraron efecto bactericida en 4 de las siete cepas estudiadas. La combinación de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de teicoplanina con gentamicina no presentó este efecto. Tras 24 h de incubación, la sinergia fue patente entre teicoplanina y gentamicina en las siete cepas de *E. faecalis* estudiadas. En la Figura 2 del Estudio 2 se muestran las curvas de letalidad de la cepa utilizada en los estudios *in vivo*. Los resultados de las combinaciones de 10 $\mu\text{g/mL}$ de teicoplanina con gentamicina a concentraciones de 1, 3 o 10 $\mu\text{g/mL}$ no difieren sustancialmente con los que se presentan en la Figura 2 del Estudio 2, para las concentraciones de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ más las diferentes concentraciones de gentamicina.

2.2. Estudios farmacocinéticos.

Los datos farmacocinéticos de teicoplanina en los conejos, determinados en conejos sanos que recibieron un dosis de 20 mg/kg de teicoplanina administrada en un bolo i.v., resultaron como sigue (media \pm DE): α_c , $7,85 \pm 3,57 \text{ h}^{-1}$; β_c , $0,1712 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$;

k_{21c} , $1,093 \pm 0,52 \text{ h}^{-1}$; k_{13c} , $1,35 \pm 0,54 \text{ h}^{-1}$; y Vc , $0,33 \pm 0,14 \text{ l/kg}$. Los perfiles de la concentraciones séricas que se observan en humanos tras la inyección de una dosis de 10 mg/kg i.v., de teicoplanina se simularon en los conejos utilizando el sistema de bombas de infusión controladas por ordenador (ver la Figura 1B del estudio 2). Los parámetros farmacocinéticos obtenidos a partir del modelo farmacocinética adaptado a los humanos fueron similares a los que se observan al administrar una dosis de teicoplanina de 10 mg/kg i.v., en los humanos (ver la Tabla 1 del Estudio 2).

Los datos farmacocinéticos obtenidos en nueve conejos sanos tras la administración de una dosis de gentamicina de 6 mg/kg i.v., fueron como sigue (media \pm DE): α_c , $2,96 \pm 0,86 \text{ h}^{-1}$; β_c , $0,6 \pm 0,13 \text{ h}^{-1}$; k_{21c} , $1,49 \pm 0,23 \text{ h}^{-1}$; k_{13c} , $1,14 \pm 0,12 \text{ h}^{-1}$; y Vc , $0,2 \pm 0,05 \text{ l/kg}$. Los resultados del modelo de farmacocinética humanizada en conejos, que reproducen los parámetros farmacocinéticas de la administración a humanos de dosis de gentamicina de 1 y $4,5 \text{ mg/kg}$ i.v., se muestran en la Tabla 1 y en la Figura 1 del Estudio 2

2.3. Tratamiento de la endocarditis experimental.

Los resultados de los estudios de eficacia terapéutica de la endocarditis experimental en conejos, causada por la cepa de *E. faecalis* EF91 se muestran en la Tabla 3 del Estudio 2. Tras tres días de tratamiento los recuentos bacterianos en las vegetaciones se habían reducido de una manera significativa en los grupos de animales que recibieron tratamiento, con respecto a los animales del grupo de control ($P < 0,001$). Las comparaciones entre los grupos de tratamiento mostraron que la teicoplanina sola fue tan eficaz como la ampicilina sola ($P > 0,05$). La reducción de las cargas bacterianas en las vegetaciones obtenidas con las combinaciones de gentamicina con ampicilina o teicoplanina resultaron significativamente más eficaces que las obtenidas con ampicilina sola ($P < 0,01$). Teicoplanina más gentamicina administrada en una sola dosis diaria o en tres dosis fraccionadas, resultaron más eficaces que teicoplanina en una sola administración ($P < 0,01$).

La combinación de teicoplanina más gentamicina a la dosis de $4,5 \text{ mg/kg}$, ambas administradas una sola vez al día y simulando los perfiles séricos farmacocinéticos

que se detectan en humanos, resultó efectiva y mostró una eficacia similar a la del tratamiento de referencia, ampicilina 2 g/4 h más gentamicina a 1 mg/kg, administrada en tres dosis fraccionadas y simulando ambos antibióticos los perfiles séricos detectados en humanos tras estas dosis y pautas de administración ($P > 0,05$).

3. Resultados Estudio 3.

Efficacy of Ceftriaxone and Gentamicin Given Once a Day by Using Human-Like Pharmacokinetics in Treatment of Experimental Staphylococcal Endocarditis

3.1. Estudios de sensibilidad *in vitro*.

Las CIMs y CBM de cloxacilina, ceftriaxona y gentamicina, frente a la cepa de *S. aureus* S5 fueron de 0,5 y 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4 y 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y 0,5 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Los intervalos de CIM obtenidas con estos antibióticos frente a las otras cuatro cepas de *S. aureus* estudiadas fueron de 0,5 a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para cloxacilina, de 4 a 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para ceftriaxona y de 0,5 a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en el caso de gentamicina. Los resultados de las curvas de letalidad de la combinación de ceftriaxona más gentamicina se muestran en la Tabla 2 del Estudio 3. La combinación de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ceftriaxona más 0,5 o 1 $\mu\text{g}/\text{m}$ de gentamicina mostró actividad sinérgica frente a las cinco cepas estudiadas y fue bactericida en 4 de ellas, incluyendo la cepa de *S. aureus* S5. La representación gráfica de la curva de letalidad obtenida con combinaciones de ceftriaxona y gentamicina para esta cepa se muestra en la Figura 2 del Estudio 3.

3.2. Estudios farmacocinéticos.

Los datos farmacocinéticos de ceftriaxona en el conejo obtenidos tras la administración de un dosis de 50 mg/kg, administrada en forma de bolo intravenoso a 7 conejos sanos fueron los siguientes (media \pm DE): fase de distribución (α), $3,7 \pm 0,41 \text{ h}^{-1}$; fase de eliminación (β), $0,42 \pm 0,07 \text{ h}^{-1}$; k_{21} (constante de eliminación la fase de distribución en conejos, en base de modelo farmacocinético bicompartimental abierto): $1,53 \pm 0,3 \text{ h}^{-1}$; k_{13} (constante de eliminación desde el compartimento central en conejos): $1,07 \pm 0,3 \text{ h}^{-1}$; y Vd: $0,16 \pm 0,01 \text{ l}/\text{kg}$. En los conejos se simuló de forma adecuada el perfil de concentraciones séricas en humanos, que se produce tras la administración de 2 g de ceftriaxona i.v., (ver Figura. 1A del Estudio 3). Tras la administración de 2 g de ceftriaxona i.v., (ver Tabla 1 del Estudio 3) los parámetros farmacocinéticos obtenidos en los conejos simulando a los de los humanos

resultaron similares. Las concentraciones séricas (media \pm DE) en los conejos a los que se les administró ceftriaxona simulando las farmacocinéticas en humanos en el pico y el valle resultaron de $242,7 \pm 17,6 \mu\text{g/mL}$ a los 15 min y de $21,6 \pm 2,9 \mu\text{g/mL}$ a las 24 h, respectivamente.

Los datos farmacocinéticos obtenidos en el suero de cinco conejos sanos tras la administración i.v., de un bolo de 100 mg/kg de cloxacilina fueron los siguientes: k_{el} , $2,78 \text{ h}^{-1}$; $t_{1/2}$ ($t_{1/2\beta}$) $0,25 \text{ h}$; y el área bajo la curva de la concentración frente al tiempo de 0 a infinito fue de ($\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$), $71,94 \text{ mg} \cdot \text{h/mL}$. El perfil farmacocinético observado en humanos tras la administración de una dosis de cloxacilina de 2 g de cloxacilina i.v., también se reprodujo de una forma adecuada en los conejos (ver la Figura 1B del Estudio 3). En la Tabla 2 del Estudio 3 se presentan los parámetros farmacocinéticos obtenidos en conejos simulando la farmacocinética humanizada (k_{el} : $1,05 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$, $t_{1/2\beta}$: $0,66 \pm 0,02 \text{ h}$; $\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$: $191,52 \pm 31,43 \text{ mg} \cdot \text{h/mL}$), y resultaron similares a los detectados en humanos tras una dosis de 2 g de cloxacilina i.v. Los parámetros farmacocinéticos observados en el suero de nueve conejos sanos tras la administración de una dosis de 6 mg/kg de gentamicina i.v., fueron los siguientes: α : $2,96 \pm 0,86 \text{ h}^{-1}$; β : $0,6 \pm 0,13 \text{ h}^{-1}$; k_{21} : $1,49 \pm 0,23 \text{ h}^{-1}$; k_{13} : $1,14 \pm 0,12 \text{ h}^{-1}$; y V_d : $0,2 \pm 0,05 \text{ L/kg}$. Los resultados de los parámetros farmacocinéticos en conejos que reproducen los que se presentan en humanos tras la administración de 1 o 4,5 mg/kg, se muestran en la Tabla 1 y en la figura 1 del estudio 3.

3.3. Estudios de eficacia *in vivo*.

Los resultados de los diferentes regímenes terapéuticos en el tratamiento de la endocarditis experimental causada por *S. aureus* S5 se muestran en la Tabla 3 del estudio 3. Los recuentos bacterianos presentes en las vegetaciones se redujeron, de forma significativa respecto al grupo de control, tras 24 h de tratamiento en todos los grupos de animales que recibieron tratamiento antibiótico ($P < 0,001$). Las comparaciones entre los grupos terapéuticos mostraron que la ceftriaxona administrada en solitario fue menos eficaz que la cloxacilina administrada sola ($P < 0,01$). Las combinaciones de gentamicina más cloxacilina o ceftriaxona se mostraron más eficaces que cloxacilina o ceftriaxona administradas como monoterapia ($P <$

0,01). La ceftriaxona más la gentamicina a dosis de 4,5 mg/kg, ambos antibióticos en una administración única diaria y simulando las farmacocinéticas mostraron una eficacia similar al tratamiento de elección, cloxacilina más gentamicina 1 mg/kg en tres dosis al día y administrados ambos antibióticos simulando los perfiles en humanos ($P > 0,05$), y fueron más eficaces que los tratamientos de cloxacilina o ceftriaxona, simulando farmacocinéticas en humano, pero administradas en solitario ($P < 0,01$).

4. Resultados del Estudio 4.

Efficacy of ampicillin combined with ceftriaxone and gentamicin in the treatment of experimental endocarditis due to *Enterococcus faecalis* with no high-level resistance to aminoglycosides

4.1. Estudios de sensibilidad *in vitro*.

Las CIM de ampicilina, gentamicina y ceftriaxona para la cepa utilizada en el estudio fueron de 0,5, 32 y 64 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, mientras que las CBMs fueron 32, 64 y $>256 \mu\text{g/mL}$. En los estudios de letalidad se obtuvo efecto bactericida y sinérgico con las combinaciones de 1 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina más gentamicina a concentraciones de 1, 3 o 10 $\mu\text{g/mL}$, y las de 1 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina y 10, 20 o 40 $\mu\text{g/mL}$ de ceftriaxona tanto a las 4 como a las 24 h de incubación. Estudios de sensibilidad, empleando la técnica de disco-difusión en agar mostraron sinergia entre la ampicilina, la gentamicina y la ceftriaxona.

3.4.2. Estudios de eficacia *in vivo*.

Los estudios de eficacia terapéutica en el modelo de endocarditis experimental en conejos causada por la cepa de *E. faecalis*, sin resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos, se muestran en la Tabla 2 del Estudio 4. A los 3 días de tratamiento los recuentos bacterianos en las vegetaciones de los animales a los que se les administró tratamiento se redujeron significativamente, comparados con los detectados en los animales del grupo de control ($P < 0,05$). Las combinaciones de ampicilina con gentamicina o ceftriaxona resultaron más eficaces que ampicilina sola ($P < 0,05$). El tratamiento con ampicilina más ceftriaxona resultó tan eficaz como la pauta recomendada de ampicilina más gentamicina, administrada en 3 dosis diarias, ($P > 0,05$). La eficacia de la ampicilina combinada con gentamicina y con ceftriaxona no resultó superior a las combinaciones dobles de ampicilina con gentamicina o ampicilina con ceftriaxona ($P > 0,05$).

4. DISCUSIÓN

1. Discusión del Estudio 1:

Efficacy of Ampicillin plus Ceftriaxone in Treatment of Experimental Endocarditis Due to Enterococcus faecalis Strains Highly Resistant to Aminoglycosides.

El primer propósito de este estudio consistió en describir el modelo matemático que determinara las dosis a administrar a los animales mediante un sistema de infusión por bomba controlado por ordenador, para obtener unos perfiles séricos en los conejos que fueran similares a los que se detectan en humanos tras la administración intravenosa de 2 g de ceftriaxona.

El enfoque terapéutico habitual en el modelo animal de endocarditis en el conejo implica la administración de los antibióticos en dosis que se calculan para conseguir unas concentraciones en el pico sérico que se encuentren dentro del intervalo de los valores obtenidos en humanos con esos mismos antibióticos. En los estudios que se incluyen en el presente trabajo, nuestro grupo usó el modelo matemático descrito, que permite determinar las dosis a administrar mediante un sistema de infusión por bombas controladas por ordenador, que permita obtener los perfiles séricos en los animales de experimentación obtenidos en los humanos tras la administración de las dosis adecuadas de los antibióticos empleados en cada uno de los diferentes estudios. Este modelo matemático puede emplearse tanto para fármacos que presentan un modelo farmacocinético monocompartimental abierto, como para los que presentan un modelo farmacocinético bicompartimental abierto.

Los estudios de la actividad de los antimicrobianos en los modelos de experimentales animales son una base necesaria para los estudios de investigación en humanos²⁶⁵. Las variaciones farmacocinéticas entre las especies son un factor importante a tener en cuenta, ya que estas características afectan a la actividad *in vivo* de los antimicrobianos^{195, 196}. Normalmente, los fármacos se administran en los modelos animales para que alcancen el pico de concentración sérico que se observa en el suero humano; No obstante, las tasas de eliminación de fármacos, mucho más elevadas en los animales, no son tenidas en cuenta. Para obviar este problema se

han descrito modelos los modelos animales de farmacocinéticas humanizadas, en los cuales se administran los fármacos para reproducir las cinéticas séricas comparables a las de los humanos^{191, 195-197, 214, 215, 224, 225, 266, 267}. Dichos estudios permiten aclarar ciertos aspectos. Así, se han podido resolver cuestiones relativas a la eficacia terapéutica que previamente no estaban resueltas^{224, 225}; además, las cinéticas animales pueden conducir a sobreestimar, en el caso de los aminoglucósidos, o a subestimar, en el caso de betalactámicos, la actividad antimicrobiana, comparada con los resultados que se obtienen de los modelos de farmacocinéticas que simulan a las que se observan en humanos^{195, 196}. Por lo tanto, el uso de modelos animales con farmacocinéticas humanizadas, son de gran interés en los estudios experimentales en modelos animales que evalúan la eficacia de diferentes tipos de antibióticos (ej.: betalactámicos frente a glucopéptidos) o las combinaciones de antibióticos. Los resultados de nuestros estudios muestran que tanto el modelo matemático desarrollado como el sistema de infusión mediante bombas de flujo variable controladas por ordenador, es simple y adaptable a la simulación, en los animales de experimentación, de las cinéticas humanas que se observan cuando se administran antimicrobianos que presentan modelos abiertos monocompartimentales y bicompartimentales.

En estudios previos realizados por nuestro grupo²⁶⁸, se desarrolló el modelo de farmacocinética humanizada adaptado a fármacos con un modelo farmacocinético monocompartimental abierto para reproducir los perfiles séricos en humanos de ampicilina. Este modelo es sencillo y adaptable a la simulación de farmacocinéticas humanizadas de antibióticos con un modelo bicompartimental abierto.

Está ampliamente aceptado que los enterococos tienen una tolerancia natural al efecto bactericida de los antibióticos betalactámicos, aunque se han encontrado ocasionalmente cepas no tolerantes²⁴⁵. En este estudio, cuando se estudió el efecto antibiótico de varias concentraciones de ampicilina, se encontró que existía efecto bactericida (con una reducción en el recuento de colonias $> 3 \log_{10}$) en 9 de las 10 cepas estudiadas, pero con un intervalo muy estrecho en las concentraciones de ampicilina. De hecho, en seis de estas nueve cepas, la “ventana” de actividad bactericida se demostró en una o dos de todas las concentraciones de ampicilina estudiadas. A concentraciones de ampicilina por encima de esta ventana de efecto

bactericida, predominó un efecto bacteriostático en las cepas estudiadas. Si solo se hubieran estudiado estas concentraciones, todas las cepas podrían considerarse como tolerantes. Aún más, en muchas determinaciones de la concentración bactericida mínima se tiende a ignorar los saltos en los tubos (aquellos que no presentan crecimiento, a concentraciones inferiores a la que se considera la CIM). La existencia de una ventana de actividad bactericida de penicilina y amoxicilina para la mayoría de cepas de *E. faecalis* estudiadas ha sido previamente descrito por otros autores ^{244, 264, 269}. Es de destacar, que la tolerancia podría haberse desarrollado mediante la exposición intermitente a betalactámicos ²⁴⁵. Experimentos de nuestro grupo sugieren que la exposición puntual y, particularmente, los regímenes con gradación escalonada de concentraciones pueden producir una selección de variantes tolerantes en compartimentos localizados en presencia de concentraciones altas y/o bajas, cerrando de esta forma la ventana bactericida ²⁷⁰.

Los datos que se obtuvieron en este estudio sugirieron que la asociación de ampicilina y ceftriaxona puede mostrar sinergia *in vitro* frente a *E. faecalis* con RAN. En todas las cepas estudiadas, se detectó una fuerte cooperación antibacteriana entre ampicilina y ceftriaxona con una reducción de las UFC/mL a las 24 h superior a 2 log en relación con el antibiótico más activo actuando en solitario. Los resultados pueden indicar que la combinación podría ser útil en las infecciones causadas por las cepas de *E. faecalis* con RAN. Se podría sugerir que las concentraciones no bactericidas de ampicilina se desplazan al intervalo bactericida por su asociación con ceftriaxona, ampliando el intervalo del efecto bactericida de la ampicilina. Con anterioridad, Mainardi et al., ²⁶⁴ detectaron este efecto sinérgico entre amoxicilina y cefotaxima; estos autores propusieron que, a concentraciones bajas de amoxicilina, las proteínas fijadoras de penicilina (PBP) 4 y 5 de bajo peso molecular, se encontraría saturadas parcialmente, con lo que las PBPs 2 y 3, no esenciales, podrían participar en la síntesis del peptidoglicano; la combinación con cefotaxima saturaría completamente estas PBPs 2 y 3, produciendo un efecto sinérgico bactericida. A concentraciones superiores, la ampicilina sola podría ser capaz de inhibir la función de las PBPs 4 y 5 produciendo un efecto bactericida óptimo. Por encima de determinada concentración (alta), la ampicilina puede inhibir las autolisinas, reduciendo la bacteriolisis, como Fontana et al., ²⁶⁹ sugirieron. Otros betalactámicos y/o asociaciones de betalactámicos pueden producir un efecto similar

así, por ejemplo, en *Enterococcus faecium* se ha comunicado un aumento del efecto bactericida de ampicilina combinada con imipenem ²⁷¹. Nuestro grupo no consiguió detectar ninguna actividad sinérgica entre ampicilina y ceftriaxona frente a *E. faecium* ²⁷², lo que confirma los resultados obtenidos por Mainardi et al., ²⁶⁴. En este estudio, concentraciones bajas de ampicilina (1 o 2 mg/L) eliminaron significativamente a todas las cepas de *E. faecalis* cuando se le asociaba ceftriaxona. La tasa de letalidad fue generalmente superior al utilizar 2 mg/L en vez de 1 mg/L, independientemente de la concentración a la que estuviera presente la ceftriaxona, lo que sugiere que la principal actividad bactericida se debía a ampicilina. Es importante resaltar que una cooperación antimicrobiana fuerte y con efecto bactericida se consiguió a concentraciones de ampicilina bajas, similares a las que se esperarían alcanzar en las vegetaciones de válvulas cardiacas.

En estudios experimentales en conejos, tras 3 días de tratamiento, la combinación de ampicilina-ceftriaxona se mostró más efectiva que ampicilina sola en reducir el tamaño de las vegetaciones y la carga bacteriana de *E. faecalis* con RAN existente dentro de la vegetación. Por lo tanto, es de notar que en cerca de la mitad de los animales que se infectaron con la cepa V45 se les detectó UFC en sus vegetaciones al final del tratamiento con la combinación. Hay, por lo tanto, concordancia entre los estudios *in vitro* e *in vivo*. En el modelo animal, la ampicilina sola puede disminuir la carga bacteriana en la válvula, pero a un nivel muy inferior de lo que la reduce en presencia de ceftriaxona. Podría considerarse que el período durante el cual las concentraciones necesarias de ampicilina para una óptima eliminación están disponibles en el huésped es demasiado corto para ser efectivo. Es bien conocido el hecho de que la actividad letal de los betalactámicos es proporcional al tiempo de exposición (el AUC) ²⁷³. La ceftriaxona, ampliando el intervalo de concentraciones bactericidas de ampicilina, aumenta el período durante el cual estas concentraciones están disponibles, y, por lo tanto, es de esperar que ocurra potenciación de la actividad bactericida. Los resultados obtenidos en el tratamiento con ampicilina sola de la endocarditis experimental por *E. faecalis* no son comparables con los de otros estudios, principalmente debido a que nuestro grupo utiliza farmacocinéticas humanizadas de ampicilina que simula una administración intravenosa de 2 g cada 4 h, y ningún otro estudio emplea esta técnica. La cantidad de fármaco, el tiempo por encima de la CIM, el AUC y la forma de esta son totalmente diferentes de aquellos

estudios que utilizando farmacocinéticas animales administran el antibiótico cada 8 o 12 h^{213, 274}, y como sería de esperar, la eficacia en nuestro estudio fue superior. En el mismo, la ampicilina sola proporcionó una reducción importante de las cargas bacterianas en las vegetaciones, pero la combinación resultó significativamente superior.

El tratamiento de la endocarditis debida a cepas de *E. faecalis* con RAN resulta controvertido. Hasta la fecha, no se conoce ningún tratamiento médico efectivo para los pacientes que presentan endocarditis por estas cepas en las cuales se demuestra sensibilidad a ampicilina pero una elevada resistencia a aminoglucósidos. Venditti et al.,²⁷⁵ describieron un paciente con endocarditis debida a *E. faecalis* con RAN en el cual el tratamiento con ampicilina más ceftriaxona fracasó. Una explicación posible de este fracaso es que la ceftriaxona tuvo que ser retirada a las 3 semanas debido a fiebre relacionada con la administración del fármaco. Nuestro grupo trató con éxito dos pacientes, uno con la combinación de ampicilina y ceftriaxona y el segundo con cefotaxima en lugar de ceftriaxona, en un paciente VIH + con colangitis por *Cryptosporidium* spp. que dificultaba el uso de la ceftriaxona²⁷⁶.

En conclusión, estos resultados muestran que, dependiendo de las cepas, existe sinergia *in vitro* frente a *E. faecalis* con RAN. De igual forma, en el tratamiento de la endocarditis experimental causada por *E. faecalis* con RAN, la utilización de farmacocinéticas humanizadas de 2 g cada 12 h de ceftriaxona combinada con 2 g cada 4 h de ampicilina, resultó una opción terapéutica eficaz. Se precisan nuevos estudios que permitan establecer si la eficacia observada en el modelo experimental es extrapolable al tratamiento de la enfermedad en el ser humano.

2. Discusión del Estudio 2:

Efficacy of Teicoplanin-Gentamicin Given Once a Day on the Basis of Pharmacokinetics in Humans for Treatment of Enterococcal Experimental Endocarditis

El objetivo de este trabajo consistió en evaluar la eficacia de teicoplanina más gentamicina, ambas administradas en una sola dosis diaria y mediante farmacocinéticas que simulan los perfiles obtenidos en humanos, en el tratamiento de la endocarditis enterocócica experimental. Los resultados muestran que una sola dosis diaria de gentamicina, combinada con teicoplanina fue tan efectiva como el tratamiento recomendado para la endocarditis por *E. faecalis* en humanos: ampicilina en combinación con 1 mg/kg/8 h de gentamicina.

Munckhof et al.,²⁷⁷ en un meta-análisis que evaluó estudios clínicos randomizados sobre la administración en una dosis única de aminoglucósidos, encontraron que estos podían administrarse en una sola dosis, en lugar de dosis fraccionadas, en el tratamiento de infecciones distintas a endocarditis sin pérdida de la eficacia ni aumento de la toxicidad, lo cual se traducía en un tratamiento más sencillo y con mejor coste-eficacia.

La ventaja de la administración de aminoglucósidos en una sola dosis para el tratamiento de la endocarditis está en la actualidad bajo discusión^{224, 258, 259, 268, 278-280}. Las combinaciones de aminoglucósidos, administrados en una sola dosis diaria, con penicilina o ceftriaxona se han mostrado efectivas en estudios de modelos de endocarditis que empleaban estreptococos del grupo viridans sensibles a penicilina^{224, 259, 263, 279}, tolerantes²⁷⁹, resistentes²⁷⁹, y variantes nutricionales²⁷⁹ o estafilococos²⁸¹. Basados en estos resultados, se puso en marcha una evaluación clínica del tratamiento de la endocarditis enterocócica mediante la combinación de ceftriaxona más netilmicina, ambas administradas una vez al día durante 2 semanas²⁸².

El uso de regímenes de combinación con aminoglucósidos administrados una vez al día en el tratamiento de la endocarditis enterocócica es un tema controvertido^{258, 268, 283-285}. Nuestros datos sugieren que el incremento del intervalo de dosificación de los

aminoglucósidos no tiene ninguna influencia en la eficacia *in vivo* de la combinación de la teicoplanina y gentamicina en el tratamiento de la endocarditis experimental enterocócica, y estos datos son similares a los obtenidos en estudios previos en los cuales se evaluó la combinación de ampicilina con la administración única diaria de gentamicina en la endocarditis por enterococos ²⁶⁸. Recientemente, Schwank y Blazer ²⁸⁵ estudiaron la administración una vez al día frente a la dosis total de netilmicina fraccionada tres veces al día, combinadas con amoxicilina, penicilina o vancomicina frente a *E. faecalis* en un modelo *in vitro* utilizando farmacocinéticas humanizadas. Estos autores concluyeron que en las condiciones experimentales no podía confirmarse que la administración en una sola dosis diaria de aminoglucósidos estuviera contraindicada en el tratamiento de infecciones causadas por enterococos. Asimismo, Houlihan et al., ²⁸³ compararon en un modelo *in vitro* de agregados fibrino-plaquetarios infectados con *E. faecalis*, las actividades farmacodinámicas de vancomicina y ampicilina solas o combinadas con gentamicina dadas en una única dosis o en tres administraciones diarias. Sus resultados no mostraron diferencias significativas en la reducción bacteriana entre los regímenes de combinación de aminoglucósidos utilizando farmacocinéticas humanizadas, administrados una o tres veces. En contraste con estos resultados, y los comunicados por nuestro grupo ²⁶⁸, Fantin y Carbon, ²⁵⁸ y Marangos et al., ²⁸⁴ encontraron que la penicilina más aminoglucósido (netilmicina o gentamicina) administrados en tres dosis diarias fueron más efectivos que la penicilina más la misma dosis total de aminoglucósido administrada de una sola vez, en el tratamiento de la endocarditis enterocócica experimental. La explicación más probable para estas discrepancias entre nuestros resultados y los obtenidos por Fantin y Carbon ²⁵⁸ y Marangos et al., ²⁸⁴ podría estribar en que las variables experimentales en los diferentes estudios son distintas, un hecho que dificulta la comparación. En primer lugar, los betalactámicos empleados (penicilina vs. ampicilina), aunque similares, poseen actividad diferente frente a *E. faecalis* ²⁸⁵. En segundo lugar, nuestro modelo experimental simula las cinéticas en humanos de 2 g/4 h i.v., de ampicilina. Se ha mostrado una relación entre la forma del AUC del beta-lactámico y sus actividades antimicrobianas ^{195, 196}, este factor también puede afectar su eficacia *in vivo* cuando se combina con aminoglucósidos. Finalmente, las dosis de aminoglucósidos administradas tres veces al día en los estudios de Fantin y Carbon, ²⁵⁸ y Marangos et al., ²⁸⁴ eran superiores a la empleada en nuestros estudios, en los cuales empleamos niveles

similares a los recomendados en el tratamiento de la endocarditis enterocócica en humanos (dosis que resultan en concentraciones en el pico sérico de 3 a 5 mg/L)²⁸⁷. Estos hechos pueden explicar el ligero incremento en eficacia (0,5 log₁₀ UFC/g de vegetación) que estos autores encontraron con el empleo de combinaciones con aminoglucósidos administrados tres veces al día. Si hubieran empleado dosis de aminoglucósidos fraccionadas en 3 dosis diarias, que resultan en un pico sérico de concentración menor (3 a 5 mg/L), quizás hubieran encontrado una actividad similar a la del régimen de beta-lactámico más la misma dosis total de aminoglucósido. En nuestra opinión, hasta la fecha no hay datos definitivos que desaconsejen el uso de una sola dosis diaria de aminoglucósidos en el tratamiento de las infecciones enterocócicas.

La teicoplanina, un glucopéptido, podría ser una alternativa a los betalactámicos en el tratamiento de la endocarditis enterocócica. La teicoplanina tienen un espectro antibacteriano similar al de vancomicina y una vida media de eliminación más prolongada, lo cual permite una sola administración diaria por vía intravenosa o por vía intramuscular²⁸⁸. Los resultados de estudios con modelos animales que evalúan la terapia con teicoplanina para la endocarditis enterocócica concuerdan con los que se presentan en este estudio. Sullam et al.,²⁸⁹ comunicaron que la teicoplanina fue tan efectiva como la ampicilina en el tratamiento de la endocarditis experimental causada por *E. faecalis*. Nuestros resultados, empleando un modelo farmacocinético humanizado, son similares a los que encontraron Sullam et al.,²⁸⁹. En este estudio teicoplanina mostró una eficacia superior a ampicilina, aunque la diferencia no tuvo significación estadística (7,25 versus 6,66 media log UFC/g de vegetación; $P > 0,05$). Asimismo, la asociación con gentamicina administrada tres veces al día incrementó la eficacia de teicoplanina sola (6,66 versus 5,07 media log UFC/g de vegetación; $P < 0,05$). En el estudio de Chambers y Kennedy²⁷⁸, se examinó el significado de diferentes parámetros farmacocinéticos en la eficacia de teicoplanina en la endocarditis experimental. La eficacia se mostró superior cuando el antibiótico se administraba por vía intramuscular en lugar de la vía intravenosa, a pesar del hecho de que un pico de concentración sérica superior se conseguía con la administración intramuscular (34 ± 10 versus 26 ± 11 mg/L). Estos autores concluían que una concentración mantenida de teicoplanina en el suero varias veces por encima de la CIM puede ser importante para desarrollar una eficacia *in vivo*, y recomendaban que

la concentración sérica en el valle debería ser de al menos 10 veces por encima de la CIM del microorganismo infectante. En nuestro estudio, la administración de teicoplanina mediante un sistema de infusión por bombas controlados por ordenador resultó en una concentración sérica en el valle a las 24 horas de la administración de $21,6 \pm 2,9$ mg/L. Esta concentración sobrepasa en casi 20 veces la CBM de teicoplanina para la cepa empleada en los experimentos *in vivo* (la cepa EF91, CIM 1 $\mu\text{g/mL}$), y este hecho puede determinar el buen resultado obtenido en nuestros experimentos con la administración de teicoplanina, sola o combinada con gentamicina.

En la literatura está descrito un pequeño número de pacientes con endocarditis por *E. faecalis* tratados con teicoplanina²⁹⁰⁻²⁹⁴. Leport et al.,²⁹¹ presentaron un caso de endocarditis enterocócica tratado con éxito con 10,6 mg/kg/día de teicoplanina durante 48 días. Martino et al.,²⁹² trataron 4 pacientes; tres de los cuales curaron, y uno recayó y requirió cirugía más tratamiento con ampicilina y gentamicina. Un tratamiento de 10 mg/kg/día durante 4 semanas se ha mostrado efectivo frente a la endocarditis estreptocócica nativa²⁹⁵. Presterl et al.,²⁹³ trataron con éxito a cinco pacientes. Lewis et al.,²⁹⁰ comunicaron un estudio europeo retrospectivo y multicéntrico en el que se incluían a 115 pacientes con endocarditis debida a bacterias gram-positivas, en el cual se evaluó la evolución, la eficacia y la seguridad de la utilización de teicoplanina sola o en combinación con otros fármacos. Habían 22 casos de endocarditis enterocócica: 10 tratados con monoterapia y 12 tratados en combinación con aminoglucósidos. Todos los pacientes tratados con la combinación se curaron, mientras que el tratamiento no fue adecuado en dos de los 10 pacientes tratados con monoterapia. A pesar de estos hallazgos prometedores, parece razonable combinar la teicoplanina con aminoglucósidos si se emplea la teicoplanina en el tratamiento de la endocarditis enterocócica.

El tratamiento domiciliario podría resultar beneficioso en la endocarditis ya que esta terapia es prolongada, y los pacientes, con frecuencia, son capaces de tener cuidado de sí mismos tras las primeras dos semanas de tratamiento. Un aspecto interesante de este tipo de tratamientos que estudian la dosis única diaria es la posibilidad de su empleo en el tratamiento de la enfermedad en régimen domiciliario, con la consiguiente reducción de costes y una mayor calidad de vida. En estudios de

endocarditis estreptocócica experimental, una sola dosis diaria de un aminoglucósido en combinación con ceftriaxona resultó tan efectiva con el tratamiento de elección con penicilina más aminoglucósidos en dosis divididas^{224, 280, 296}. La teicoplanina más gentamicina, ambas administradas en una sola dosis diaria, podría constituir una alternativa terapéutica para casos seleccionados de endocarditis enterocócica en régimen ambulatorio, probablemente tras dos semanas de tratamiento hospitalario. Los resultados de nuestros experimentos mostraron que teicoplanina más gentamicina, ambos en una administración diaria, utilizando un sistema de infusión por bomba controlada por computadora, que simula las cinéticas humanas, resultó tan efectivo como el tratamiento de elección, 2 g de ampicilina cada 4 horas más 1 mg/kg/8h de gentamicina. Los resultados de un estudio clínico realizado por Venditti et al.,²⁹⁵ proporcionan evidencia de que una sola dosis diaria de teicoplanina más gentamicina podría constituir una buena opción terapéutica para el tratamiento domiciliario de casos seleccionados de pacientes con endocarditis enterocócica. Seis pacientes con endocarditis enterocócica alcanzaron la curación cuando se les trató con teicoplanina combinada con gentamicina o netilmicina administradas una vez al día.

En conclusión, la eficacia de la combinación de teicoplanina más gentamicina, ambas administradas una vez al día, mostrada en nuestros experimentos, indica que esta combinación puede ser valiosa en el tratamiento de la endocarditis enterocócica y puede ser útil como tratamiento domiciliario en casos de endocarditis enterocócica no complicada. Nuevos estudios servirían para esta establecer la eficacia real de este enfoque terapéutico en pacientes con endocarditis enterocócica.

3. Discusión del Estudio 3.

Efficacy of Ceftriaxone and Gentamicin Given Once a Day by Using Human-Like Pharmacokinetics in Treatment of Experimental Staphylococcal Endocarditis

El objetivo del presente estudio fue determinar la eficacia de ceftriaxona más gentamicina, ambos administrados en una sola dosis que simulaba el perfil farmacocinético en humanos de estos antibióticos, en comparación con el tratamiento estándar de cloxacilina más gentamicina para el tratamiento de la endocarditis experimental causada por *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (SASM). Nuestros resultados mostraron que ambas combinaciones fueron igual de efectivas y que fueron superiores al tratamiento con cloxacilina o ceftriaxona solas. Como terapia única, la cloxacilina se mostró ligeramente más efectiva que la cefalosporina.

Las cefalosporinas de espectro reducido son activas principalmente frente a organismos grampositivos e *in vitro* son equivalentes a las penicilinas antiestafilocócicas frente al SASM²⁹⁷. También han mostrado su eficacia en el tratamiento de la endocarditis experimental por SASM. Las actividades de cefalotina y cefazolina fueron similares a la de la meticilina en el tratamiento de la endocarditis estafilocócica experimental, a pesar de la inactivación *in vitro* por betalactamasa²⁹⁸.²⁹⁹ En contraste, las cefalosporinas de amplio espectro son, en general, menos activas que la nafcilina y la cefazolina frente a SASM³⁰⁰. En el estudio de Dhawan et al.,³⁰¹ que comparaba las actividades de cefmenoxima, cefotaxima, latamoxef y nafcilina en el tratamiento de la endocarditis experimental por SASM, la nafcilina mostró una eficacia similar a la de latamoxef y fue superior a cefmenoxima y cefotaxima. Steckelberg et al.,³⁰² compararon las eficacias de cefpiroma, cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona, cefotaxima, ceftizoxima, cefoperazona, ceftazidima y nafcilina en el tratamiento de endocarditis experimental debida a SASM. *In vivo*, el antibiótico más activo fue la nafcilina. Nuestros resultados concuerdan con estas comunicaciones previas. El grupo terapéutico que recibió ceftriaxona mostró una evolución inferior a la presentada por el grupo tratado con cloxacilina sola. La

ceftriaxona sola fue menos eficaz que cloxacilina en el tratamiento de la endocarditis experimental por SASM.

La penicilina o una penicilina antiestafilocócica combinada con un aminoglucósido se ha mostrado efectiva, tanto *in vitro* como en modelos animales con infección por *S. aureus* sensible a meticilina³⁰³⁻³⁰⁵. Existen pocos datos experimentales de la eficacia de ceftriaxona combinada con un aminoglucósido en el tratamiento de la endocarditis estafilocócica. Tallan et al., comunicaron que la ceftriaxona a dosis de 7,5 mg/kg/día administrada intramuscularmente (i.m.) combinada con gentamicina a 1,5 mg/kg/día i.m., fue más activa que 50 mg/8 h de cefazolina por kg i.m., sin combinar y resultó tan activa como cefazolina más 1 mg/kg/8h de gentamicina por vía i.m.³⁰⁶ Los resultados de nuestros experimentos están en concordancia con estas comunicaciones previas. La eficacia de la terapia combinada fue claramente superior a la obtenida con los betalactámicos administrados solos. El intervalo de dosificación de los aminoglucósidos es un tema que aún está bajo discusión. En un meta-análisis dirigido por Munckhof et al.,²⁷⁷ se evaluaron todos los estudios clínicos randomizados que versaban sobre la administración en una sola dosis diaria de los aminoglucósidos. Los autores concluían que los aminoglucósidos pueden administrarse en una sola dosis en lugar de dosis divididas en el tratamiento de infecciones humanas, que no fueran endocarditis, sin pérdida de eficacia o incremento de toxicidad, lo que proporciona una mayor eficacia y una mejora potencial en la relación coste-eficacia. Recientemente el resultado de gentamicina administrada una sola vez al día, en lugar de tres dosis, se ha evaluado en el tratamiento de endocarditis experimental no estafilocócica^{224, 259, 260, 268, 279, 283, 285, 307}. Hasta la fecha, la eficacia de gentamicina administrada una sola vez al día en el tratamiento de la endocarditis experimental por SASM no se ha evaluado. Nuestros resultados confirmaron el hecho de que con la gentamicina administrada una vez al día en combinación con cloxacilina o ceftriaxona, se obtenían unos resultados similares a los logrados con cloxacilina y gentamicina administrada en tres dosis diarias.

La ceftriaxona y la teicoplanina tienen una vida media ($t_{1/2}$) prolongada (6 a 9 h), lo cual posibilita su administración una vez al día. La evaluación de sus eficacias, cuando se combinan con aminoglucósidos administrados en una única dosis para el

tratamiento de la endocarditis experimental por diferentes microorganismos, podría llevar a plantear estrategias terapéuticas que permitieran, en pacientes seleccionados, el tratamiento de estas infecciones de una forma ambulatoria. Aunque es posible la administración de la oxacilina mediante una bomba de infusión programable para terapia domiciliaria, esta opción no siempre está disponible, y los regímenes terapéuticos que pueden administrarse una vez al día merecen más atención. Nuestro grupo demostró en un estudio previo que la teicoplanina combinada con gentamicina, administradas una vez al día, era tan efectiva como el tratamiento de elección de la endocarditis enterocócica experimental, ampicilina más gentamicina administrada en tres dosis divididas³⁰⁷. Los resultados de un estudio clínico reciente, llevado a cabo por Venditti et al.,²⁹⁵ proporcionan más evidencias de que una sola dosis de teicoplanina más gentamicina podría ser una buena opción en el tratamiento domiciliario de casos seleccionados de endocarditis enterocócica. Seis pacientes con endocarditis enterocócica resultaron curados cuando se les trató con teicoplanina combinada con gentamicina o netilmicina administradas una vez al día. Además, la eficacia en humanos de una sola administración diaria de aminoglucósidos asociados con ceftriaxona también ha sido documentada en el tratamiento de la endocarditis por estreptococos del grupo viridans^{282, 308}. En dos estudios clínicos se demostró que un régimen de 2 semanas de ceftriaxona más gentamicina, o 4 semanas de tratamiento con ceftriaxona, fueron eficaces y seguros en el tratamiento de la endocarditis estreptocócica causada por cepas sensibles a penicilina y permiten el control ambulatorio parcial o total de pacientes seleccionados. No hay estudios experimentales que hayan evaluado este aspecto en el modelo animal de endocarditis estafilocócica. Nuestros estudios mostraron que la ceftriaxona, administrada, simulando la farmacocinética en humanos, a una dosis de 2 g más gentamicina, simulando la dosis en humanos de 4,5 mg/kg, ambas administradas en una sola dosis diaria, fue efectiva y demostró una actividad similar a la del tratamiento recomendado, cloxacilina. Existen pocos datos en la literatura relativos a la eficacia de esta combinación en el tratamiento en humanos. Francioli,²⁹⁵ comunicó que una sola inyección diaria de ceftriaxona y gentamicina administrada durante 15 días permitió tratar con éxito a 14 pacientes con endocarditis por *S. aureus*, en Camerún.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en nuestros experimentos sugieren que la combinación de ceftriaxona con gentamicina, ambos dosificados en una sola administración diaria, podría tenerse en consideración como una alternativa al tratamiento de elección y, en pacientes seleccionados, tras su estabilización, facilitando con ello la posibilidad de introducir un régimen terapéutico ambulatorio en el tratamiento de la endocarditis por SASM. No obstante, se requieren nuevos estudios en modelos animales y en humanos que confirmen estos datos.

4. Discusión del Estudio 4:

Efficacy of ampicillin combined with ceftriaxone and gentamicin in the treatment of experimental endocarditis due to *Enterococcus faecalis* with no high-level resistance to aminoglycosides

Los objetivos planteados en el presente estudio fueron: primero, evaluar en el modelo animal de endocarditis la utilidad de la ceftriaxona combinada con ampicilina como una alternativa al tratamiento recomendado, la ampicilina más gentamicina, en el tratamiento de la endocarditis causada por una cepa de *E. faecalis* que no presentaba resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos (RAN), empleando para ello tratamientos farmacocinéticas humanizadas; en segundo lugar, determinar si la adición de un tercer antibiótico (combinación de ampicilina, ceftriaxona y gentamicina) incrementa la eficacia de una combinación doble frente a esta enfermedad. Los resultados obtenidos mostraron que la ampicilina más la ceftriaxona fue tan efectiva como el tratamiento de elección (ampicilina más gentamicina) de la endocarditis experimental. La combinación de tres antibióticos no reportaron una mejor eficacia con respecto a las combinaciones de dos antibióticos, ampicilina más gentamicina o ampicilina más ceftriaxona.

Los estudios *in vitro* mostraron que había sinergia entre la ampicilina y la ceftriaxona frente a la cepa EF91. Un efecto sinérgico *in vitro* similar fue descrito por Mainardi et al., utilizando amoxicilina y cefotaxima²⁶⁴. No obstante, esta última combinación no se mostró eficaz *in vivo* en el tratamiento de la endocarditis experimental, en la cual se emplearon dos cepas de *E. faecalis*, una con y otra sin RAN a los aminoglucósidos. Los autores concluyeron que la eficacia *in vivo* no se conseguía debido a que la amoxicilina sola ya era bactericida *in vivo* y el período de tiempo durante el cual los dos antibióticos estaban presentes simultáneamente y a una concentración adecuada para conseguir sinergia *in vivo* era muy limitado³⁰⁹. En contraste, nuestros resultados muestran que la combinación de ampicilina más ceftriaxona fue tan efectiva como ampicilina más gentamicina administrada en 3 dosis diarias. La eficacia de la combinación fue comparable a la eficacia que nuestro grupo con anterioridad había descrito, de la combinación de ampicilina a dosis de 2 g/4 h combinada con 2 g de ceftriaxona cada 12 h, ambos antibióticos

administrados a los animales simulando las farmacocinéticas humanizadas de estas dosis, para el tratamiento de la endocarditis experimental causada por cepas de *E. faecalis* con RAN a aminoglucósidos, que es la primera publicación incluida en estos estudios ³¹⁰.

Las discrepancias entre nuestros resultados y los comunicados por Join-Lambert ³⁰⁹ se podrían explicar por las diferencias entre las variables experimentales: los betalactámicos en los dos estudios eran diferentes y pueden exhibir diferente actividad frente a *E. faecalis*, y nuestro modelo experimental simula las cinéticas que se observan en el suero de humanos de 2 g de ampicilina i.v., cada 4 h y de 2 g de ceftriaxona i.v., cada 12 h. Por otro lado, también se ha establecido la relación entre la forma del AUC de los betalactámicos y su actividad antibacteriana; por lo tanto, la simulación de las farmacocinéticas séricas de los humanos se aproxima más a la situación clínica.

La combinación de ampicilina con ceftriaxona ensancha el panorama de alternativas terapéuticas en el tratamiento de la endocarditis enterocócica. La toxicidad asociada al empleo de los aminoglucósidos depende fundamentalmente de la duración del tratamiento, de la edad del paciente y de la cantidad total de antibiótico administrada ³¹¹. Puesto que la endocarditis enterocócica aparece predominantemente en pacientes de edad avanzada, y la edad está asociada a un mayor riesgo de nefrotoxicidad debida a los aminoglucósidos, ³¹¹ este grupo de enfermos podrían beneficiarse de un tratamiento que presenta menor toxicidad. Recientemente, nuestro grupo comunicó la experiencia de 20 episodios de endocarditis enterocócica tratados con ampicilina combinada con ceftriaxona o cefotaxima, en la cual se incluían 13 episodios debidos a cepas con RAN a los aminoglucósidos y 7 episodios causados por cepas sin RAN a aminoglucósidos ³¹². Dieciséis pacientes recibieron tratamiento con cefalosporina, durante al menos un mes y todos curaron; solo tres enfermos requirieron cirugía y ninguno de los pacientes desarrolló insuficiencia renal. Se concluyó que la combinación de ampicilina más ceftriaxona o cefotaxima era segura y eficaz en el tratamiento de la endocarditis enterocócica causada por cepas con y sin RA a los aminoglucósidos.

La endocarditis enterocócica aún carece de un tratamiento que sea completamente satisfactorio. El tratamiento estándar, ampicilina más gentamicina, no consigue la

curación en todos los casos y su duración prolongada expone a los pacientes a riesgos derivados del tratamiento. Aún se requieren esfuerzos que lleven a encontrar combinaciones que curen a un porcentaje mayor de casos, y tratamientos que resulten en una eficacia superior con una menor duración. En el presente estudio, la eficacia obtenida con la adición de ceftriaxona a la combinación de ampicilina con gentamicina fue similar a la que mostraron las combinaciones dobles de ampicilina con gentamicina o ceftriaxona. La combinación de tres antibióticos no mejoró la eficacia global de las combinaciones dobles. Hay poca experiencia en combinaciones triples para el tratamiento de endocarditis enterocócica experimental. Caron et al.,³¹³ encontraron que la penicilina combinada con gentamicina y vancomicina resultó eficaz en el tratamiento de la endocarditis experimental causada por *E. faecium* con resistencia de alto nivel a penicilina y glucopéptidos, mientras que la penicilina o la vancomicina combinadas solamente con gentamicina no eran tan eficaces. Estos autores detectaron la emergencia de una subpoblación de enterococos resistentes a la combinación de penicilina y vancomicina, lo que redujo la utilidad de esta combinación. En conclusión, en nuestro estudio, la eficacia de la combinación de ampicilina más ceftriaxona resultó comparable a la de ampicilina más gentamicina. Ya que con el tratamiento de ampicilina más ceftriaxona existe un riesgo relativo bajo de nefrotoxicidad, esta podría ser una combinación valiosa para tratar endocarditis enterocócicas debidas a cepas sin RAN a aminoglucósidos en pacientes de edad avanzada, o en aquellos que presenten una enfermedad renal de base o signos de toxicidad. Serían necesarios nuevos estudios que evalúen la eficacia real en humanos con endocarditis enterocócica de esta alternativa terapéutica.

5. CONCLUSIONES

1. Conclusiones.

- 1 – El modelo animal de endocarditis en conejos es adecuado y reproducible para simular *in vivo* una forma de patología que presenta una gran similitud con las características anatomofisiopatológicas de la enfermedad observada en humanos.
- 2 – El empleo de bombas de infusión programables, controladas por ordenador ,permiten reproducir en el suero de los animales de experimentación los perfiles séricos farmacocinéticos de antibióticos obtenidos en los seres humanos.
- 3 – En el tratamiento de la endocarditis bacteriana experimental en conejos es posible la administración de antibióticos a través de una farmacocinética que simula la observada en humanos; lo cual permite una mejor aproximación a las situaciones clínicas de interacción entre los factores del huésped, los microorganismos y los antimicrobianos.
- 4 – La utilización de una farmacocinética humanizada, en el modelo de endocarditis bacteriana experimental en conejos, permite una evaluación de la eficacia de nuevas pautas terapéuticas simulando, en el experimento, no solo la enfermedad, sino los parámetros farmacocinéticos séricos que presentan los antibióticos en humanos, aproximándose así de una forma más parecida a lo que ocurre en la práctica clínica.
- 5 – La combinación de teicoplanina más gentamicina, ambas administradas en una sola dosis, en el tratamiento de la endocarditis experimental en conejos, causada por *Enterococcus faecalis*, y empleando farmacocinéticas humanizadas, presenta

una eficacia similar a la del tratamiento estándar, ampicilina más gentamicina, administrada en tres dosis diarias.

- 6 – En el tratamiento de la endocarditis experimental en conejos causada por *Staphylococcus aureus*, la administración en una sola dosis diaria de ceftriaxona más gentamicina, simulando la farmacocinética en humanos, se ha mostrado tan eficaz como la administración de dosis fraccionadas de cloxacilina y gentamicina, simulando los perfiles farmacocinéticos que se consiguen con estos fármacos en humanos.
- 7 – Empleando el modelo de endocarditis experimental en conejos y simulando en este modelo los perfiles farmacocinéticos de humanos es posible concluir que la combinación de ampicilina y ceftriaxona es eficaz en el tratamiento de la endocarditis experimental por *Enterococcus faecalis* con un alto nivel de resistencia a aminoglucósidos.
- 8 – La combinación de ampicilina y ceftriaxona, administradas ambas simulando las farmacocinéticas de estos antibióticos en humanos, constituye una alternativa terapéutica eficaz en el tratamiento de la endocarditis experimental enterocócica, en conejos infectados con *Enterococcus faecalis* que no presenta resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1- Thayer WS. 1926. Studies on bacterial (infective) endocarditis. Johns Hopkins Hosp Rep. 22: 1.
- 2- Lerner PI, Weinstein L. 1966. Infective endocarditis in the antibiotic era. N Engl J Med; 274. 199-206; 259-266, 323-331, 388-393.
- 3- von Reyn CF, Levy BS, Arbeit RD, Friedland G, Crumpacker CS. 1981. Infective endocarditis: An analysis based on strict case definitions. Ann Intern Med. 94: 505-518.
- 4- Steckelberg JM, Melton LJ III, Ilstrup DM, Rouse MS, Wilson WR. 1990. Influence of referral bias on the apparent clinical spectrum of infective endocarditis. Am J Med. 88: 582-588.
- 5- Harris SL. 1992. Definitions and demographic characteristics. In: Kaye D, ed. Infective Endocarditis. Raven Press. New York.
- 6- Durack DT, Petersdorf RG. 1977. Changes in the epidemiology of endocarditis. In: Kaplan EL, Taranta AV, eds. Infective Endocarditis. An American Heart Association Symposium. Dallas: American Heart Association.
- 7- Griffin MR, Wilson WR, Edwards WD, O'Fallon WM, Kurland LT. 1985. Infective endocarditis. Olmsted County, Minnesota, 1950 through 1981. JAMA. 254: 1199-1202.
- 8- King JW, Nguyen VQ, Conrad SA. 1988. Results of a prospective statewide reporting system for infective endocarditis. Am J Med Sci. 295: 517-527.
- 9- Shulman ST. 1986. Infective endocarditis:1986. Pediatr Infect Dis. 5: 691-694.
- 10- Watanakunakorn C, Burkert T. 1993. Infective endocarditis at a large community teaching hospital, 1980-1990. Medicine (Baltimore). 72: 90-102.
- 11- Hayward GW. 1973. Infective endocarditis: A changing disease I. Br Med J. 2: 706-709.

-
- 12- Infective endocarditis (Editorial). 1981. *Br Med J*.;1: 677.
 - 13- Gold MJ. 1992. Cure rates and long term prognosis. p 455. En: Kaye D, ed. *Infective Endocarditis*. Raven Press. New York
 - 14- Garvey GJ, Neu HC. 1978. Infective endocarditis – an evolving disease: a review of endocarditis at the Columbian-Presbyterian Medical Center, 1968-1973. *Medicine (Baltimore)*. 57:105-127.
 - 15- Lien EA, Solberg CO, Kalager T. 1988. Infective endocarditis 1973–1984 at the Bergen University Hospital: Clinical features, treatment and prognosis. *Scand J Infect Dis*. 20: 239–246.
 - 16- Watanakunakorn C. 1977. Changing epidemiology and newer aspects of infective endocarditis. *Adv Intern Med*. 22: 21-47.
 - 17- Come PC. 1982. Infective endocarditis: Current perspectives. *Compr Ther*. 8: 57-70.
 - 18- Kaplan EL. 1977. Infective endocarditis in the pediatric age group: An overview. In: Kaplan EL, Taranta AV, eds. *Infective Endocarditis*. An American Heart Association Symposium. American Heart Association. Dallas. Tx. USA.
 - 19- Baltimore RS. 1992. Infective endocarditis in children. *Pediatr Infect Dis J*. 11: 907-912.
 - 20- Pelletier LL, Petersdorf RG. 1977. Infective endocarditis: A review of 125 cases from the University of Washington Hospitals, 1963–72. *Medicine (Baltimore)*. 56: 287-313.
 - 21- Terpenning MS, Buggy BP, Kaufmann CA. 1988. Hospital-acquired infective endocarditis. *Arch Intern Med*. 148:1601–1603.
 - 22- Cherubin CE, Neu HC. 1971. Infective endocarditis at the Presbyterian Hospital in New York City from 1938–1967. *Am J Med*.51: 83.

-
- 23- Roberts WC, Buchbinder NA. 1972. Right-sided valvular infective endocarditis. A clinicopathologic study of 12 necropsy patients. *Am J Med.* 53: 7-19.
 - 24- Kaye D. 1985. Changing pattern of infective endocarditis. *Am J Med.* 78 (Suppl 6B): 157–162.
 - 25- Roberts WC, Perloff JK, Constantino T. 1971. Severe valvular aortic stenosis in patients over 65 years of age. *Am J Cardiol.* 27: 497-506.
 - 26- Delahaye JP, Loire R, Milon H, Durand de Gevigney G, Delahaye F, Boissonnat P, Zambartas C, Etienne J, Malquarti V. 1988. Infective endocarditis on stenotic aortic valves. *Eur Heart J.* 9 (Suppl E): S43–S49.
 - 27- Gersony WM, Hayes CJ, Driscoll DJ, Keane JF, Kidd L, O'Fallon WM, Pieroni DR, Wolfe RR, Weidman WH. 1993. Bacterial endocarditis in patients with aortic stenosis, pulmonary stenosis, or ventricular septal defect. *Circulation.* 87(Suppl I): 121-126.
 - 28- McKinsey DS, Ratts TE, Bisno AL. 1987. Underlying cardiac lesions in adults with infective endocarditis. The changing spectrum. *Am J Med.* 82: 681–688.
 - 29- Lowes JA, Hamer J, Williams G, Houang E, Tabaqchali S, Shaw EJ, Hill IM, Rees GM. 1980. Ten years of infective endocarditis at St. Bartholomew's hospital: Analysis of clinical features and treatment in relation to prognosis and mortality. *Lancet (i):* 133-136.
 - 30- Mouldsdale MT, Eykyn SJ, Phillips I. 1980. Infective endocarditis, 1970–1979. A study of culture-positive cases in St. Thomas' Hospital. *Q J Med.*;49: 315-328.
 - 31- Venezio FR, Westenfelder GO, Cook FV, Emmerman J, Phair JP. 1982. Infective endocarditis in a community hospital. *Arch Intern Med.* 142: 789-792.

-
- 32- Fulkerson PK, Beaver BM, Auseon JC, Graber HL. 1979. Calcification of the mitral annulus: Etiology, clinical associations, complications and therapy. *Am J Med.* 66: 967-977.
 - 33- Kreuzpaintner G, Horstkotte D, Heyll A, Losse B, Strohmeyer G. 1992. Increased risk of bacterial endocarditis in inflammatory bowel disease. *Am J Med.* 92: 391-395.
 - 34- Cardelia JV, Befeler B, Hildner FJ, Samet P. 1971. Hypertrophic subaortic stenosis complicated by aortic insufficiency and subacute bacterial endocarditis. *Am Heart J.* 81: 543-547.
 - 35- Wang K, Gobel FL, Gleason DF. 1975. Bacterial endocarditis in idiopathic hypertrophic subaortic stenosis, *Am Heart J.* 89: 359-365.
 - 36- Chagnac A, Rudniki C, Loebel H, Zahavi I. 1982. Infectious endocarditis in idiopathic hypertrophic subaortic stenosis. Report of three cases and review of the literature. *Chest.* 81: 346-349.
 - 37- Welton DE, Young JB, Gentry WO, Raizner AE, Alexander JK, Chahine RA, Miller RR. 1979. Recurrent infective endocarditis: Analysis of predisposing factors and clinical features. *Am J Med.* 66: 932.
 - 38- Jeresaty RM. 1973. Mitral valve prolapse—click syndrome. *Prog Cardiovasc Dis.* 15: 623-652.
 - 39- Schutte JE, Gaffney FA, Blend L, Blomqvist CG. 1981. Distinctive anthropometric characteristics of women with mitral valve prolapse. *Am J Med.* 71: 533-538.
 - 40- Corrigall D, Bolen J, Hancock EW, Popp RL. 1977. Mitral valve prolapse and infective endocarditis. *Am J Med.* 63: 215-222.
 - 41- Devereaux RB, Kramer-Fox R, Kligfield P. 1989. Mitral valve prolapse: Causes, clinical manifestations, and management. *Ann Intern Med.* 111: 305–317.

- 42- Clemens JD, Horwitz RI, Jaffe CC, Feinstein AR, Stanton BF. 1982. A controlled evaluation of the risk of bacterial endocarditis in persons with mitral-valve prolapse. *N Engl J Med.* 307: 776-781.
- 43- Tunkel AR, Scheld WM. 1992. Experimental models of endocarditis. In: *Infective Endocarditis*, 2nd ed. (ed Kaye D.) pp. 37-56. Raven Press. New York.
- 44- Freedman LR. 1987. The pathogenesis of infective endocarditis. *J Antimicrob Chemother.* 20 (Suppl A):1-6.
- 45- Weinstein L, Schlesinger JJ. 1974. Pathoanatomic, pathophysiologic, and clinical correlations in endocarditis (first of two parts). *N Engl J Med.* 291: 832-837.
- 46- Angrist AA, Oka M. 1963. Pathogenesis of bacterial endocarditis. *JAMA.*183: 249-252.
- 47- Durack DT, Beeson PB. 1978. Pathogenesis of infective endocarditis. In: Rahimtoola SH, ed. *Infective Endocarditis*. 1. Grune & Stratton. New York.
- 48- Durack DT, Beeson PB. 1972. Experimental bacterial endocarditis I: colonisation of a sterile vegetation. *Br J Exp Pathol.* 53: 44-49.
- 49- Durack DT, Beeson PB, Petersdorf RG. 1973. Experimental bacterial endocarditis III: production and progress of the disease in rabbits. *Br J Exp Pathol.* 54: 142-151.
- 50- Durack DT. 1975. Experimental bacterial endocarditis IV: structure and evolution of very early lesions. *J Pathol.* 115: 81-89.
- 51- McGowan DA, Gillett R. 1980. Scanning electron microscopic observations of the surface of the initial lesion in experimental streptococcal endocarditis in the rabbit. *Br J Exp Pathol.*61: 164-171.
- 52- Livornese LL Jr, Korzeniowski OM. 1992. Pathogenesis of infective endocarditis. In: Kaye D, (ed.) *Infective Endocarditis*. Raven Press. New York.

-
- 53- Sherwood BF, Rowlands DT, Vakilizadeh J, LeMay JC. 1971. Experimental bacterial endocarditis in the opossum (*Didelphis virginiana*). Am J Pathol. 64: 513-520
- 54- Ferguson DJP, McColm AA, Ryan DM, Acred P. 1986. Experimental staphylococcal endocarditis and aortitis. Morphology of the initial colonization. Virchows Arch [A]. 410: 43-48.
- 55- Rodbard S. 1963. Blood velocity and endocarditis. Circulation. 27: 18-28.
- 56- Lepeschkin E. 1952. On the relation between the site of valvular involvement in endocarditis and the blood pressure resting on the valve. Am J Med Sci. 224: 318.
- 57- Okell CC, Elliott SD. 1935. Bacteraemia and oral sepsis. With special reference to the aetiology of subacute endocarditis. Lancet. 2: 869.
- 58- Everett ED, Hirschmann JV. 1977. Transient bacteremia and endocarditis prophylaxis: A review. Medicine (Baltimore). 56: 61-77.
- 59- Loesche WJ. 1977. Indigenous human flora and bacteremia. In: Kaplan EL, Taranta AV, eds. Infective Endocarditis. An American Heart Association Symposium. Dallas: American Heart Association. 40.
- 60- Durack DT, Beeson PB. 1977. Protective role of complement in experimental *Escherichia coli* endocarditis. Infect Immun. 16: 213-217.
- 61- Gould K, Ramirez-Ronda CH, Holmes RK, Sanford JP. 1975. Adherence of bacteria to heart valves in vitro. J Clin Invest. 56: 1364-1370.
- 62- Baddour LM, Lowrance C, Albus A, Lowrance JH, Anderson SK, Lee JC. 1992. *Staphylococcus aureus* microcapsule expression attenuates bacterial virulence in a rat model of experimental endocarditis. J Infect Dis. 165: 749-753.
- 63- Overholser CD, Moreillon P, Glauser MP. 1987. Experimental bacterial endocarditis after dental extraction in rats with periodontitis. J Infect Dis. 155: 107-112.

-
- 64- Moreillon P, Overholser CD, Malinverni R, Bille J, Glauser MP. 1988. Predictors of endocarditis in isolates from cultures of blood following dental extractions in rats with periodontal disease. *J Infect Dis.* 157: 990–995.
- 65- Parker MT, Ball LC. 1976. Streptococci and aerococci associated with systemic infection in man. *J Med Microbiol.* 9: 275-302.
- 66- Scheld WM, Valone JA, Sande MA. 1978. Bacterial adherence in the pathogenesis of endocarditis. Interaction of bacterial dextran, platelets, and fibrin. *J Clin Invest.* 61: 1394-1404.
- 67- Ramírez Ronda CH. 1978. Adherence of glucan-positive and glucan-negative streptococcal strains to normal and damaged heart valves. *J Clin Invest.* 62: 805-814.
- 68- Ramírez Ronda CH. 1980. Effects of molecular weight of dextran on the adherence of *Streptococcus sanguis* to damaged heart valves. *Infect Immun.* 29: 1-7.
- 69- Pelletier LL Jr, Coyle M, Petersdorf R. 1978. Dextran production as a possible virulence factor in streptococcal endocarditis. *Proc Soc Exp Biol Med.* 158: 415-420.
- 70- Dall L, Barnes WG, Lane JW, Mills J. 1987. Enzymatic modification of glycocalyx in the treatment of experimental endocarditis due to viridans streptococci. *J Infect Dis.* 156: 736–740.
- 71- Dall LH, Herndon BL. 1990. Association of cell adherent glycocalyx and endocarditis production by viridans group streptococci. *J Clin Microbiol.* 28: 1698-1700.
- 72- Crawford I, Russell C. 1986. Comparative adhesion of seven species of streptococci isolated from the blood of patients with subacute bacterial endocarditis to fibrin-platelet clots in vitro. *J Appl Bacteriol.* 60: 127-133.

-
- 73- Fenno JC, LeBlanc DJ, Fives-Taylor P. 1989. Nucleotide sequence analysis of a type 1 fimbrial gene of *Streptococcus sanguis* FW213. *Infect Immun.* 57: 3527–3533.
- 74- Burnette-Curley D, Wells V, Viscount H, Munro CL, Fenno JC, Fives-Taylor P, Macrina FL. 1995. FimA, a major virulence determinant associated with *Streptococcus parasanguis* endocarditis. *Infect Immun.* 63: 4669–4674.
- 75- Viscount HB, Munro CL, Burnette-Curley D, Peterson DL, Macrina FL. 1997. Immunization with FimA protects against *Streptococcus parasanguis* endocarditis in rats. *Infect Immun.* 65: 994–1002.
- 76- Scheld WM, Zak O, Vosbeck K, Sande MA. 1981. Bacterial adhesion in the pathogenesis of endocarditis. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on streptococcal adhesion in vitro and the development of endocarditis in rabbits. *J Clin Invest.* 68: 1381-1384.
- 77- Scheld WM, Strunk RW, Balian G, Calderone RA. 1985. Microbial adhesion to fibronectin in vitro correlates with production of endocarditis in rabbits. *Proc Soc Exp Biol Med.* 180: 474–482.
- 78- Kuypers JM, Proctor RA. 1989. Reduced adherence to traumatized rat heart valves by a low-fibronectin-binding mutant of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 57: 2306-2312.
- 79- Lowrance JH, Baddour LM, Simpson WA. 1990. The role of fibronectin binding in the rat model of experimental endocarditis caused by *Streptococcus sanguis*. *J Clin Invest.* 86: 7-13.
- 80- Becker RC, DiBello PM, Lucas FV. 1987. Bacterial tissue tropism: An in vitro model for infective endocarditis. *Cardiovasc Res.* 21: 813–820.
- 81- Tart RC, van de Rijn I. 1991. Analysis of adherence of *Streptococcus defectivus* and endocarditis-associated streptococci to extracellular matrix. *Infect Immun.* 59: 857-862.

-
- 82- Sommer P, Gleyzal C, Guerret S, Etienne J, Grimaud JA. 1992. Induction of a putative laminin-binding protein of *Streptococcus gordonii* in human infective endocarditis. *Infect Immun.* 60: 360-365.
- 83- Vercellotti G, Lussenhop D, Peterson PK, Furcht LT, McCarthy JB, Jacob HS, Moldow CF. 1984. Bacterial adherence to fibronectin and endothelial cells: A possible mechanism for bacterial tissue tropism. *J Lab Clin Med.* 103: 34-43.
- 84- Ogawa SK, Yurberg ER, Hatcher VB, Levitt MA, Lowy FD. 1985. Bacterial adherence to human endothelial cells in vitro. *Infect Immun.* 50: 218-224.
- 85- Hamill RJ, Vann JM, Proctor RA. 1986. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic-endothelial cells: Model for post adherence events in endovascular infections. *Infect Immun.* 54: 833-836.
- 86- Yao L, Bengualid V, Lowy FB, Gibbons JJ, Hatcher VB, Berman JW. 1995. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces cytokine gene expression. *Infect Immun.* 63:1835-1839.
- 87- Devitt D, Francois P, Vaudaux P, Foster TJ. 1994. Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 11: 237-248.
- 88- Moreillon P, Entenza JM, Francioli P, McDevitt D, Foster TJ, Francois P, Vaudaux P. 1995. Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. *Infect Immun.* 63: 4738-4743.
- 89- Flock JI, Hienz SA, Heimdahl A, Schennings T. 1996. Reconsideration of the role of fibronectin binding in endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.*;64:1876-1878.
- 90- Heinz SA, Schennings T, Heimdahl A, Flock J-I. 1996. Collagen binding of *Staphylococcus aureus* is a virulence factor in experimental endocarditis. *J Infect Dis.*174: 83-88

-
- 91- Herrmann M, Suchard SJ, Boxer LA, Waldvogel FA, Lew PD. 1991. Thrombospondin binds to *Staphylococcus aureus* and promotes staphylococcal adherence to surfaces. *Infect Immun.* 59: 279–288.
- 92- Bayer AS, Ramos MD, Menzies BE, Yeaman MR, Shen AJ, Cheung AL. 1997. Hyperproduction of alpha-toxin by *Staphylococcus aureus* results in paradoxically reduced virulence in experimental endocarditis—host defense role for platelet microbicidal proteins. *Infect Immun.* 65: 4652–4660.
- 93- Bernard JP, Francioli P, Glauser MP. 1981. Vancomycin prophylaxis of experimental *Streptococcus sanguis* endocarditis: Inhibition of bacterial adherence rather than bacterial killing. *J Clin Invest.* 68: 1113-1116.
- 94- Glauser MP, Francioli P. 1982. Successful prophylaxis against experimental streptococcal endocarditis with bacteriostatic antibiotics. *J Infect Dis.* 146: 806-810.
- 95- Lowy FD, Chang DS, Neuhaus EG, Horne DS, Tomasz A, Steigbigel NH. 1983. Effect of penicillin on the adherence of *Streptococcus sanguis* in vitro and in the rabbit model of endocarditis. *J Clin Invest.* 71: 668-675.
- 96- Durack DT, Beeson PB, Petersdorf RG. 1972 a. Experimental bacterial endocarditis II: survival of bacteria in endocardial vegetation. *Br J Exp Pathol.* 53: 50-53.
- 97- Yersin BR, Glauser MP, Freedman LR. 1982. Effect of nitrogen mustard on natural history of right-sided streptococcal endocarditis: Role of cellular host defenses. *Infect Immun.* 35: 320-325.
- 98- Hook EW III, Sande MA. 1974. Role of the vegetation in experimental *Streptococcus viridans* endocarditis. *Infect Immun.* 10: 1433-1438.
- 99- Thorig L, Thompson J, Eulderink F, Emeis JJ, Van Furth R. 1980. Effects of monocytopenia and anticoagulation in experimental *Streptococcus sanguis* endocarditis. *Br J Exp Pathol.* 61: 108-116.

-
- 100- van Ginkel CJ, Thorig L, Thompson J, Oh JI, van Aken WG. 1979. Enhancement of generation of monocyte tissue thromboplastin by bacterial phagocytosis: Possible pathway for fibrin formation on infected vegetations in bacterial endocarditis. *Infect Immun.* 25: 388-395.
- 101- Drake TA, Rodgers GM, Sande MA. 1984. Tissue factor is a major stimulus for vegetation formation in enterococcal endocarditis in rabbits. *J Clin Invest.* 73: 1750–1753.
- 102- Drake TA, Pang M. 1988. *Staphylococcus aureus* induces tissue factor expression in cultured human cardiac valve endothelium. *J Infect Dis.* 157: 749–756.
- 103- Mair W. 1923. Pneumococcal endocarditis in rabbits. *J Pathol Bacteriol.* 26: 426.
- 104- Scheld WM, Thomas JH, Sande MA. 1979. Influence of preformed antibody on experimental *Streptococcus sanguis* endocarditis. *Infect Immun.* 25: 781-785.
- 105- Durack DT, Gilliland BC, Petersdorf RG. 1978. Effect of immunization on susceptibility to experimental *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* endocarditis. *Infect Immun.* 22: 52-56.
- 106- van de Rijn I. 1988. Analysis of cross-protection between serotypes and passively transferred immune globulin in experimental nutritionally variant streptococcal endocarditis. *Infect Immun.* 56: 117-121.
- 107- Scheld WM, Calderone RA, Brodeur JP, Sande MA. 1983. Influence of preformed antibody on the pathogenesis of experimental *Candida albicans* endocarditis. *Infect Immun.* 40: 950-955 .
- 108- Greenberg DP, Ward JI, Bayer AS. 1987. Influence of *Staphylococcus aureus* antibody on experimental endocarditis in rabbits. *Infect Immun.* 55: 3030–3034.

-
- 109- Sieling PJ, van de Rijn I. 1991. Evaluation of the immune response in protection against experimental *Streptococcus defectivus* endocarditis. J Lab Clin Med. 117: 402-409.
- 110- Williams RC Jr, Kunkel HG. 1962. Rheumatoid factors and their disappearance following therapy in patients with SBE. Arthritis Rheum. 5: 126.
- 111- Sheagren JN, Tuazon CV, Griffin C, Padmore N. 1976. Rheumatoid factor in acute bacterial endocarditis. Arthritis Rheum. 19: 887-890.
- 112- Phair JP, Clarke J. 1979. Immunology of infective endocarditis. Prog Cardiovasc Dis. 22: 137-144.
- 113- Bacon PA, Davidson C, Smith B. 1974. Antibodies to *Candida* and autoantibodies in subacute bacterial endocarditis. Q J Med. 43: 537-550.
- 114- Laxdal T, Messner RP, Williams RC. 1968. Opsonic, agglutinating, and complement-fixing antibodies in patients with subacute bacterial endocarditis. J Lab Clin Med. 71: 638-653.
- 115- Horwitz D, Quismorio FP, Friou GJ. 1975. Cryoglobulinemia in patients with infectious endocarditis. Clin Exp Immunol. 19:131.
- 116- Qoronfleh MW, Weraarchakul W, Wilkinson BJ. 1993. Antibodies to a range of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* heat shock proteins in sera from patients with S. aureus endocarditis. Infect Immun. 61:1567-1570.
- 117- Bayer AS, Theofilopoulos AN, Eisenberg R, Dixon FJ, Guze LB. 1976. Circulating immune complexes in infective endocarditis. N Engl J Med. 295: 1500-1505.
- 118- Gutman RA, Striker GE, Gilliland BC, Cutler RE. 1972. The immune complex glomerulonephritis of bacterial endocarditis. Medicine (Baltimore). 51: 1-25.
- 119- Levy RL, Hong R. 1973. The immune nature of subacute bacterial endocarditis (SBE) nephritis. Am J Med. 54: 645-652.

- 120- Inman RD, Redecha PB, Knechtle SJ, Schned ES, van de Rijn I, Christian CL. 1982. Identification of bacterial antigens in circulating immune complexes of infective endocarditis. *J Clin Invest.* 70: 271-280.
- 121- Alpert JS, Krous HF, Dalen JE, O'Rourke RA, Bloor CM. 1976. Pathogenesis of Osler's nodes. *Ann Intern Med.* 85: 471-473.
- 122- Lowenstein MB, Urman JD, Abeles M, Weinstein A. 1977. Skin immunofluorescence in infective endocarditis. *JAMA.* 238: 1163-1165.
- 123- Cabane J, Godeau P, Herreman G, Acar J, Digeon M, Bach JF. 1979. Fate of circulating immune complexes in infective endocarditis. *Am J Med.* 66: 277-282.
- 124- Kauffmann RH, Thompson J, Valentijn RM, Daha MR, Van Es LA. 1981. The clinical implications and the pathogenetic significance of circulating immune complexes in infective endocarditis. *Am J Med.* 71: 17-25.
- 125- McFarland MM. 1992. Pathology of infective endocarditis. 57. In: Kaye D, ed. *Infective Endocarditis.* Raven Press. New York.
- 126- Roberts WC. 1978. Characteristics and consequences of infective endocarditis (active or healed or both) learned from morphologic studies. In: Rahimtoola SH, ed. *Infective Endocarditis.* Grune y Stratton. New York.
- 127- Morel-Maroger L, Sraer JD, Herreman G. 1913. Kidney in subacute endocarditis. Pathological and immunofluorescence findings. *Arch Pathol.* 94:205.
- 128- Anderson CB, Butcher HR, Ballinger WF. 1974. Mycotic aneurysms. *Arch Surg.* 109: 712-717.
- 129- Greenlee JE, Mandell GL. 1973. Neurological manifestations of infective endocarditis: A review. *Stroke.* 4: 958-963.
- 130- Masuda J, Yutani C, Waki R, Ogata J, Kuriyama Y, Yamaguchi T. 1992. Histopathologic analysis of the mechanisms of intracranial hemorrhage complicating infective endocarditis. *Stroke.* 23: 843-850.

-
- 131- Kerr A Jr, Tan JS. 1979. Biopsies of the Janeway lesion of infective endocarditis. *J Cutan Pathol.* 6: 124-129.
- 132- Wilson WR, Giuliani ER, Danielson GK, Geraci JE. 1982. General considerations in the diagnosis and treatment of infective endocarditis. *Mayo Clin Proc.* 57: 31-35.
- 133- Sarriá C, Vilacosta I, San Román JA. 2002. Tratamiento médico de la endocarditis infecciosa. En: *Endocarditis Infecciosa*. I. Vilacosta, C. Sarriá y JA San Román eds. Prous Sciences. Barcelona. España.
- 134- Drake TA, Sande MA. 1986. Experimental endocarditis. En: *Experimental models in antimicrobial chemotherapy*. Vol 1. Zak, O. ed. Academic Press, Inc. London.
- 135- Carbon C, Crémieux AC, Fantin B. 1993. Pharmacokinetics and pharmacodynamic aspects of therapy of experimental endocarditis. *Infect. Dis Clin North Am.* 7: 37-51.
- 136- Carbon C. 1993. Experimental endocarditis: A review of its relevance to human endocarditis. *J Antimicrob Chemother.* 31 (Suppl. D): 71-85.
- 137- Crémieux AC, Carbon C. 1992. Pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of therapy of experimental endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* 36: 2069-2074.
- 138- Ribbert MWH. 1885. Beitrage zur Localisation der Infektionskrankheiten. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 11. 717-719.
- 139- Garrison PK, Freedman LR. 1970. Experimental endocarditis in rabbits I: Staphylococcal endocarditis in rabbits resulting from placement of a polyethylene catheter in the right side of the heart. *Yale J. Biol. Med.* 42: 394-410.
- 140- Sande MA, Irwin RG. 1974. Penicillin-aminoglycoside synergy in experimental *Streptococcus viridans* endocarditis. *J. Infect. Dis.* 129 : 572-576.

-
- 141- Gutschik E, Christensen N. 1978. Experimental endocarditis in rabbits. I: Techniques and spontaneous course of nonbacterial thrombotic endocarditis. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B Microbiol.* 86: 215-221.
- 142- Gutschik E, Christensen N. 1978. Experimental endocarditis in rabbits. II: Course of untreated *Streptococcus faecalis* infection. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B Microbiol.* 86: 223-228
- 143- Lefort A, Fantin B. 1999. Rabbit model of bacterial endocarditis. In: *Handbook of animal models of infection*, 2nd ed. (Ed. Zak, O., Sande, M.E.). pp. 611-617. Academic Press. London.
- 144- Fantin B, Leclercq R, Duval J, Carbon C. 1993. Fusidic acid alone or in combination with vancomycin for therapy of experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 39: 400-405.
- 145- Walker WF, Hamburguer M. 1959. A study of experimental endocarditis in dogs I. Production of the disease, its natural history and tissue bacteriology. *J Lab Clin Med.* 53: 931-941.
- 146- Walker WF, Hamburguer M, Clark KL, Carleton J. 1961. Study of experimental staphylococcal endocarditis in dogs III. Effects of tetracycline dosage upon eradication of staphylococci from tissues and upon development of tetracycline resistant staphylococci. *J Lab Clin Med.* 59: 481-489.
- 147- Keys TF, Sapico FL, Touchan R, Barenfus M, Hewitt WL. 1972. Experimental enterococcal endocarditis I. Description of a canine model. *Am J Med Sci.* 263 103-109.
- 148- Sapico FL, Keys TF, Hewitt WL. 1972. Experimental enterococcal endocarditis II. Study of in vivo synergism of penicillin and streptomycin. *Am J Med Sci.* 263: 128-135.

- 149- Perlman BB, Freedman LR. 1971. Experimental endocarditis II. Staphylococcal infection of the aortic valve following placement of a polyethylene catheter in the left side of the heart. *Yale J Biol Med.* 44: 206-213.
- 150- Perlman BB, Freedman LR. 1971. Experimental endocarditis III. Natural history of catheter induced staphylococcal endocarditis following catheter removal. *Yale J Biol Med.* 44: 206-213.
- 151- Gutschik E, Norwood RS, Moller S, Olling S. 1979. Experimental endocarditis in rabbits 3. Significance of the proteolytic capacity of infecting strains of *Streptococcus faecalis*. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B.* 87: 353-362.
- 152- Gutschik E, Norwood RS, Moller S, Olling S. 1980. Experimental endocarditis in rabbits 4. Experiments with *Serratia marcescens* on the significance of serum susceptibility and the proteolytic capacity of the strains and the influence of the indwelling catheter. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B.* 88: 269-276.
- 153- Gutschik E, Mortensen I, Moller S. 1982. Experimental endocarditis in rabbits 5. Results of long term penicillin or streptomycin therapy and the effect of long term exposure of healthy rabbits to the same drugs. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B.* 90: 25-35.
- 154- Gutschik E. 1982. Experimental endocarditis in rabbits 6. Results of long term combined therapy of *Streptococcus faecalis* endocarditis with penicillin and streptomycin. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B.* 90: 37-47.
- 155- Gutschik E, Mortensen I, Moller S. 1982. Experimental endocarditis in rabbits 7. Results of long term combined therapy of *Streptococcus faecalis* endocarditis with penicillin and gentamicin. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B.* 90: 295-302.
- 156- Santoro J, Levison ME. 1978. Rat model of experimental endocarditis. *Infect Immun.* 19: 915-918.

-
- 157- Imataka K, Kitahara Y. 1987. Experimental production of mitral valve and papillary muscle lesions by cervical vagus stimulation in rabbits. *J Cardiol* 14 (Sup): 21-36.
- 158- Imataka K, Kitahara Y, Fuji J. 1989. Production of experimental infective endocarditis in rabbit mitral valve prolapse induced by vagus stimulation. *J Cardiol* 18 (Sup): 57-63.
- 159- Grogan EL, Sande MA, Clark RE, Nolan SP. 1980. Experimental endocarditis in calf after tricuspid valve replacement. *Ann Thorac Surg.* 30: 64-69.
- 160- Enzler MJ, Rouse MS, Henry NK, Geraci JE, Wilson WR. 1987. In vitro and in vivo studies of streptomycin-resistant, penicillin-susceptible streptococci from patients with infective endocarditis. *J Infect Dis.* 155: 954-958.
- 161- Rouse MS, Wilcox RM, Henry NK, Steckelberg JM, Wilson WR. 1990. Ciprofloxacin therapy of experimental endocarditis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 34: 273-276.
- 162- Freedman LR, Valone J Jr. 1979 Experimental infective endocarditis. *Prog. Cardiovasc Dis*; 22: 169-180.
- 163- Pujadas R, Permanyer G, Foz M, Argimon J, Rosell F, Jane J, Prats G. 1984. Reduction of the susceptibility to infective endocarditis with time in animals with endocavitary catheters. *Br J Exp Pathol*; 65: 683-690.
- 164- Pelletier LL, Petersdorf RG, Nielson K. 1976 Chemotherapy of experimental streptococcal endocarditis. V. Effect of duration of infection and retained intracardiac catheter on response to treatment. *J Lab Clin Med.* 87: 692-702.
- 165- Bayer AS, Norman DC, Kim KS. 1985. Efficacy of amikacin and ceftazidime in experimental aortic valve endocarditis due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 28: 781-785.

-
- 166- Bayer AS, Norman DC. 1990. Valve-site specific pathogenetic differences between right-sided and left-sided bacterial endocarditis. *Chest*. 98: 200-205.
- 167- Carrizosa J, Kaye D. 1976. Antibiotic synergism in enterococcal endocarditis. *J Lab Clin Med*. 88: 132-141.
- 168- Francioli P, Freedman LR. 1979. Streptococcal infection of endocardial and other intravascular vegetations in rabbits: natural history and effect of dexamethasone. *Infect. Immun*. 24: 483-491.
- 169- Southwick FS, Durack DT. 1974. Chemotherapy of experimental streptococcal endocarditis III. Failure of a bacteriostatic agent (tetracycline) in prophylaxis. *J Clin Pathol*. 27: 261-264.
- 170- Carrizosa J, Kobasa WD, Kaye D. 1975 a. Antagonism between chloramphenicol and penicillin in streptococcal endocarditis in rabbits. *J Lab Clin Med*. 85: 307-311.
- 171- Carrizosa J, Kaye D. 1977. Antibiotic concentrations in serum, serum bactericidal activity, and results of therapy of streptococcal endocarditis in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother*. 12: 479-483.
- 172- Carrizosa J, Kobasa WD, Kaye D. 1980. Comparison of ceforanide, cefazolin, methicilin, and nafcillin in *Staphylococcus aureus* endocarditis in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother*. 18: 562-565.
- 173- Korzeniowski M, Wennersten C, Moellering RC Jr, Sande MA. 1978. Penicillin-netilmicin synergism against *Streptococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 13: 430-434.
- 174- Wolfson JS, Swartz MN. 1985. Serum bactericidal activity as monitor of antibiotic therapy. *N Engl J Med*. 312: 968-975.
- 175- Coleman DL, Horwitz RI, Andriole VT. 1982. Association between serum inhibitory and bactericidal concentrations and therapeutic outcome in bacterial endocarditis. *Am J Med*. 73: 260-267.

-
- 176- Weinstein MP, Stratton CW, Ackley A, Hawley HB, Robinson PA, Fisher BD, Alcid DV, Stephens DS, Reller LB. 1985. Multicenter collaborative evaluation of a standardized serum bactericidal test as a prognostic indicator in infective endocarditis. *Am J Med.* 78: 262-269.
- 177- Lorian V, Zak O, Vaxelaire J. 1984. Staphylococcal endocarditis in rabbits treated with a low dose of cloxacillin. *Antimicrob Agents Chemother.* 25: 311-315.
- 178- Crémieux AC, Maziere B, Vallois JM, Ottaviani M, Azancot A, Raffoul H, Bouvet A, Pocidal JJ, Carbon C. 1989. Evaluation of antibiotic diffusion into cardiac vegetations by quantitative autoradiography. *J Infect Dis.* 159 : 938-944.
- 179- Karchmer AW, Moellering RC Jr, Maki DG, Swartz MN. 1979. Single-antibiotic therapy of streptococcal endocarditis. *JAMA,* 241: 1801-1806.
- 180- Mizen L, Woodnutt G. 1988. A critique of animal pharmacokinetics. *J Antimicrob Chemother.* 21: 273-278.
- 181- Dalhoff A, Ullmann U. 1990. Correlation between pharmacokinetics, pharmacodynamics and efficacy of antibacterial agents in animal models. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 9 : 479-487.
- 182- Chung M, Radwanski E, Loebenberg D, Lin CC, Oden E, Symchowicz S, Gural RP, Miller GH. 1985. Interspecies pharmacokinetic scaling of SCH34343. *J Antimicrob Chemother.* 15 (supl. C): 227-233.
- 183- Mordenti J. 1986. Man versus beast: pharmacokinetic scaling in mammals. *J Pharmaceut Sci.* 75 : 1028-1040.
- 184- Zak O, O'Reilly T. 1991. Animal models in the evaluation of antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 35: 1527-1531.
- 185- Gerber AU, Feller C, Brugger HP. 1984. Time course of the pharmacological response to beta-lactam antibiotics in vitro and in vivo. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 3 : 592-597.

-
- 186- Drusano GL. 1988. Role of pharmacokinetics in the outcome of infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 32: 289-297.
- 187- Frimodt-Moller N. 1988. Correlation of in vitro activity and pharmacokinetic parameters with effect in vivo for antibiotics. Observations from experimental pneumococcus infection. *Dan Med Bull.* 35: 422-437.
- 188- Vogelman B, Gudmundsson S, Legget J, Turnidge J, Ebert S, Craig WA. 1988. Correlation of antimicrobial pharmacokinetic parameters with therapeutic efficacy in an animal model. *J Infect Dis.* 158 : 831-847.
- 189- Legget JE, Ebert S, Fantin B, Craig WA. 1991. Comparative dose-effect relations at several dosing intervals for beta-lactam, aminoglycoside and quinolone antibiotics against Gram-negative bacilli in murine thigh infection and pneumonitis models. *Scand J Infect Dis.* (supl. 74) 179-184.
- 190- Williams RT. 1974. Inter-species variations in the metabolism of xenobiotics. *Biochem Soc Trans.* 2: 359-377.
- 191- Woodnutt G, Catherall EJ, Kernutt I, Mizen L. 1988. Temocillin efficacy in experimental *Klebsiella pneumoniae* meningitis after infusion into rabbit plasma to simulate antibiotic concentrations in human serum. *Antimicrob Agents Chemother.* 32: 1705-1709.
- 192- Eagle H, Fleischman R, Musselman AD. 1950. Effecto of schedule of administration on the therapeutic efficacy of penicillin: importance of the aggregate time penicillin remains at effectively bactericidal levels. *Am J Med.* 9: 280-299.
- 193- Eagle H, Fleischman R, Levy M. 1953. Continuous vs. discontinuous therapy with penicillin: the effect of the interval between injections on therapeutic efficacy. *N Engl J Med.* 248: 481-488.
- 194- Hunter PA, Rolinson GN, Witting DA. 1976. Effect of carbenicillin on *Pseudomonas* infection. pp. 289-283. Vol. 2. In *Chemotherapy*, ed. JD Williams, AM Geddes.

-
- 195- Gerber AU, Brugger HP, Feller C, Stritzko T, Stalder B. 1986. Antibiotic therapy of infections due to *Pseudomonas aeruginosa* in normal and granulocytopenic mice: comparison of murine and human pharmacokinetics. *J Infect Dis.* 153 : 90-98.
- 196- Gerber AU, Stritzko T, Seggessenmann C, Stalder B. 1991. Simulation of human pharmacokinetic profiles in mice, and impact on antimicrobial efficacy of netilmicin, ticarcillin and ceftazidime in the mouse peritonitis septicaemia model. *Scand. J Infect Dis. (suppl. 74)* : 195-203.
- 197- Fluckiger U, Segessenmann C, Gerber AU. 1991. Integration of pharmacokinetics and pharmacodynamics of imipenem in a human-adapted mouse model. *Antimicrob Agents Chemother.* 35: 1905-1910.
- 198- Hishikawa T, Kusunoki T, Tsuchiya K, Uzuka Y, Sakamoto T, Nagatake T, Matsumoto K. 1990. Application of mathematical model to experimental chemotherapy of fatal murine pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother.* 34: 326-331.
- 199- Hatano K, Wakai Y, Watanabe Y, Mine Y. 1994. Simulation of human plasma levels of beta-lactams in mice by multiple dosing and the relationship between the therapeutic efficacy and pharmacodynamic parameters. *Chemotherapy.* 40: 1-7.
- 200- Craig WA, Moffat J, Redington J. 1991. Effect of human kinetics on activity of cefpirome in murine thigh model. Abst. 1192. En Programa y abstracts del 31st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago. USA. 29 Sept-2 Oct. American Society for Microbiology. Washington, DC.
- 201- Craig WA, Redington J, Ebert SC. 1991. Pharmacodynamics of amikacin in vitro and in mouse thigh and lung infections. *J Antimicrob Chemother (supl. C)*, 29-40.
- 202- Fantin B, Ebert S, Legget J, Vogelmann B, Craig WA. 1990. Factors affecting duration of in-vivo post-antibiotic effect for aminoglycosides against Gram-negative bacilli. *J Antimicrob Chemother.* 27: 1905-1910.

-
- 203- Kunts MW, Mattie H. 1978. Probenecid and the antibacterial activity of cephadrine in vivo. *J Infect Dis.* 137: 830-834.
- 204- Joly V, Pagon B, Brion N, Vallois JM, Carbon C. 1988. Enhancement of the therapeutic effect of cephalosporins in experimental endocarditis by altering the pharmacokinetics with diclofenac. *J Pharm Exp Ther.* 246: 695-700.
- 205- Mattie H, Kunts MW. 1978. Animal models for the assessment of a potentiation of antibiotics by probenecid and by host response. *Infection.* 6 (supl. 1): s36-s37.
- 206- Craig WA, Ebert SC. 1992. Continuous infusion of beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 36: 2577-2583.
- 207- Vondrazek TG. 1995. Beta-lactam antibiotics: is continuous infusion the preferred method of administration? *Ann. Pharmacother.* 29: 415-424.
- 208- Benko AS, Cappelletty DM, Kruse JA, Rybak MJ. 1996. Continuous infusion versus intermittent administration of ceftazidime in critically ill patients with suspected Gram-negative infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 40: 691-695.
- 209- Daenen S, de Vries-Hospers H. 1988. Cure of *Pseudomonas aeruginosa* infection in neutropenic patients by continuous infusion of ceftazidime. *Lancet I:* 937.
- 210- James JK, Palmer SM, Levine DP, Rybak MJ. 1996. Comparison of conventional dosing versus continuous-infusion vancomycin therapy for patients with suspected or documented gram-positive infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 40: 696-700.
- 211- Bakker-Woudenberg IA, van den Berg JC, Vree TB, Baars AM, Michel MF. 1985. Relevance of serum protein binding of cefoxitin and cefazolin to their activities against *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in rats. *Antimicrob Agents Chemother.* 28: 654-659.

-
- 212- Naziri W, Cheadle WG, Trachtenberg LS, Montgomery WD, Polk HC Jr. 1995. Second place winner of the Conrad Jobst Award in the gold medal paper competition. Increased antibiotic effectiveness in a model of surgical infection through continuous infusion. *Am. Surg.* 61: 11-15.
- 213- Thauvin C, Eliopoulos GM, Willey S, Wennersten C, Moellering RC Jr. 1987. Continuous infusion ampicillin therapy of enterococcal endocarditis in rats. *Antimicrob Agents Chemother.* 31: 139-143.
- 214- Woodnutt G, Berry V, Mizen L. 1992. Simulation of human serum pharmacokinetics of cefazolin, piperacillin, and BRL 42715 in rats and efficacy against experimental intraperitoneal infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 36: 1427-1431.
- 215- Mizen L, Woodnutt G, Kernutt I, Catherall EJ. 1989. Simulation of human serum pharmacokinetics of ticarcillin-clavulanic acid and ceftazidime in rabbits, and efficacy against experimental *Klebsiella pneumoniae* meningitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 33: 693-699.
- 216- Woodnutt G, Berry V, Catherall EJ. 1992. Simulation of human serum concentrations of amoxicillin/clavulanate in the rat using a computer controlled model – efficacy in an experimental wound infection. Abstract 29. p 46. *Int. Symp. Bacterial Infection Models in Antimicrobial Chemotherapy.* Helsinore. Denmark. Oct. 26-28.
- 217- Woodnutt G, Larque E, Berry V, Wells J. 1993. Efficacy of simulated human serum concentrations of amoxicillin and clavulanic acid against an *Haemophilus influenzae* respiratory tract infection – comparison with cefaclor and cefuroxime. Abstract 371, 18th *Int. Congress Chemother.* Stockholm, Sweden, June 27-July 2. American Society for Microbiology. Washington DC.
- 218- Woodnutt G, Berry V, Bryant J, Gisby J, Slocombe B. 1995. Efficacité de l'association amoxicilline-acide clavulanique dans un modèle d'abcès sous-cutané à *E. coli* chez le rat après simulation de l'administration chez homme de 1 g/200 mg (IVD) ou de 2 g/200 mg (perfusion) : pp 23-26. In *Augmentin*

- ®. Actualites et mode d'emploi, La Lettre de L'Infectologue, Numero hors, Fevrier. Edimark. France.
- 219- Woodnutt G, Berry V, Bryant J, Gisby J. 1995. Relationship between in vitro activity of ticarcillin/clavulanate and in vivo efficacy. Abstract 1199, 19th Int. Congress of Chemother., Montreal: In Canadian J Inf. Disease. 6 Suppl C. Pulsus Group Inc., Canada.
- 220- Woodnutt G, Berry V, Bryant J, Gisby J, Slocombe B. 1995. In vivo efficacy of amoxicillin/clavulanate against strains of *E. coli* with differing in vitro susceptibility. Abstract 1200, 19th Int. Congress of Chemother. Montreal: In Canadian J Inf. Disease. 6 Suppl C. Pulsus Group Inc., Canada.
- 221- Woodnutt G, Berry V, Bryant J. 1995. Comparative efficacy of amoxicillin and ampicillin against *Streptococcus pneumoniae* experimental respiratory tract infections using simulated human serum concentrations. Abstract A80. 35th Interscience Conference on Antimicrobials Agents and Chemotherapy. San Francisco, USA 17-20 Sept. American Society for Microbiology, Washington DC.
- 222- Woodnutt G, Berry V, Bryant J. 1996. Evaluation of reduced dosing schedule of amoxicillin using two pharmacodynamic models. Abstract A40 . 36th Interscience Conference on Antimicrobials Agents and Chemotherapy. New Orleans, USA 15-18 Sept. American Society for Microbiology, Washington DC.
- 223- Veng-Pedersen P. 1980. Model dependent method of analysing input in linear pharmacokinetics systems having polyexponential impulse response I and II. J Pharm. Sci., 69: 298-311.
- 224- Blatter M, Fluckiger U, Entenza J, Glauser MP, Francioli P. 1993. Simulated human serum profiles of one daily dose of ceftriaxone plus netilmicin in treatment of experimental streptococcal endocarditis. Antimicrob Agents Chemother. 37: 1971-1976.
- 225- Fluckiger U, Moreillon P, Blaser J, Bickle M, Glauser MP, Francioli P. 1994. Simulation of amoxicillin pharmacokinetics in humans for the prevention of

- streptococcal endocarditis in rats. *Antimicrob Agents Chemother.* 38: 2846-2849.
- 226- Entenza JM, Blatter M, Glauser MP, Moreillon P. 1994. Parenteral sparfloxacin compared with ceftriaxone in treatment of experimental endocarditis due to penicillin-susceptible and -resistant streptococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 38: 2683-2688.
- 227- Entenza JM, Fluckiger U, Glauser MP, Moreillon P. 1994. Antibiotic treatment of experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect. Dis.* 170 : 100-109.
- 228- Anhalt JP. 1985. Antimicrobial assays, p. 691–729. In J. A. Washington II (ed.), *Laboratory procedures in clinical microbiology*. Springer-Verlag, New York, N.Y.
- 229- Megran DW. 1992. Enterococcal endocarditis. *Clin Infect Dis.* 15: 63-71.
- 230- Eliopoulos GM. 1993. Aminoglycoside resistant enterococcal endocarditis. *Infect Dis Clin North.* 7: 117-133.
- 231- Mandell GL, Kaye D, Levison ME, Hook EW. 1970. Enterococcal endocarditis: An analysis of 38 patients observed at the New York Hospital–Cornell Medical Center. *Arch Intern Med.* 125: 258-264.
- 232- Kazanjian PH. 1993. Infective endocarditis: Review of 60 cases treated in community hospitals. *Infect Dis Clin Pract.* 2: 41.
- 233- Serra P, Brandimarte C, Martino P, Carlone S, Giunchi G. 1977. Synergistic treatment of enterococcal endocarditis; in vitro and in vivo studies. *Arch Intern Med.* 137: 1562-1567.
- 234- Geraci JE, Martin WJ. 1954. Antibiotic therapy of bacterial endocarditis. VI. Subacute enterococcal endocarditis: clinical, pathologic and therapeutic consideration of 33 cases. *Circulation.* 10: 173-194.
- 235- Herztein J, Ryan JL, Mangi RJ, Greco TP, Andriole VT. 1984. Optimal therapy for enterococcal endocarditis. *Am J Med.* 76: 186-191.

-
- 236- Koenig MG, Kaye D. 1961. Enterococcal endocarditis: report of nineteen cases with long-term follow-up data. *N Engl J Med.* 264: 257-264.
- 237- Maki DG, Agger WA. 1988. Enterococcal bacteremia: clinical features, the risk of endocarditis, and management. *Medicine (Baltimore).* 67: 248-269.
- 238- Wilson WR, Wilkowske CJ, Wright AJ, Sande MA, Geraci JE. 1984. Treatment of streptomycin-susceptible and streptomycin-resistant enterococcal endocarditis. *Ann Intern Med.* 100: 816-823.
- 239- Moellering RC Jr, Watson BK, Kunz LJ,. 1974. Endocarditis due to group D streptococci: comparison of disease caused by *Streptococcus bovis* with that produced by the enterococci. *Am J Med.* 57: 239-250.
- 240- Malone DA, Wagner RA, Myers JP, Watanakunakorn C. 1986. Enterococcal bacteremia in two large community teaching hospitals. *Am J Med.* 81: 601–606.
- 241- Hoffmann SA, Moellering RC Jr. 1987. The *Enterococcus*: “Putting the bug in our ears.” *Ann Intern Med.* 106: 757–561.
- 242- Olaison L, Shadewitz K. 2002. Enterococcal endocarditis in Sweden: 1995-1999: Can shorter therapy with aminoglycosides be used?. *Clin Infect Dis.* 34 : 159-166.
- 243- Cercenado E, Eliopoulos GM, Wennersten C, Moellering RC Jr. 1992. Influence of highlevel gentamicin resistance and beta-hemolysis on susceptibility of enterococci to the bactericidal activities of ampicillin and vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 36: 2526–2528.
- 244- Fontana R, Grossato A, Ligozzi M, Tonin EA. 1990. In vitro response to bactericidal activity of cell wall-active antibiotics does not support the general opinion that enterococci are naturally tolerant to these antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 1518–1522.
- 245- Hodges TL, Zigelboim-Daum S, Eliopoulos GM, Wennersten C, Moellering RC Jr. 1992. Antimicrobial susceptibility changes in *Enterococcus faecalis*

-
- following various penicillin exposure regimens. *Antimicrob Agents Chemother*; 36: 121–125.
- 246- Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. 1998. Antibiotic treatment of streptococcal, enterococcal and staphylococcal endocarditis. *Heart*. 79: 207-210.
- 247- Wilson WR, Karchmer AW, Dajani AS, Thaubert KA, Bayer A, Kaye D, Bisno AL, Ferrieri P, Shulman ST, Durack DT. 1995. Antibiotic treatment of adults with infective endocarditis due to *Streptococci*, *Enterococci*, *Staphylococci*, and HACEK microorganisms. *JAMA*. 274: 1706-1713.
- 248- Palomino J, Pachón, J. 2003. Aminoglucósidos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 21 : 105-114.
- 249- Lacy MK, Nicolau DP, Nightingale CH, Quintiliani R. 1998. The pharmacodynamics of aminoglycosides. *Clin Infect Dis*. 27: 23-27.
- 250- Blaser J, Stone BB, Groner MC, Zinner SH. 1987. Comparative study with enoxacin and netilmicin in a pharmacodynamic model to determine importance of ratio of antibiotic peak concentration to MIC for bactericidal activity and emergence of resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 31: 1054-1060.
- 251- Freeman CD, Nicolau DP, Belliveau PP, Nightingale CH. 1997. Once-daily dosing of aminoglycosides: review and recommendations for clinical practice. *J Antimicro Chemother*. 677-686.
- 252- MacArthur RD, Lolans V, Zar FA, Jackson GG. 1984. Biphasic, concentration-dependent and rate-limited, concentration-independent bacterial killing by an aminoglycoside antibiotic. *Journal of Infectious Diseases*. 150: 778–779.
- 253- Gerber AU. 1988. Comparison of once-daily versus thrice daily human equivalent dosing of aminoglycosides: basic considerations and experimental approach. *Journal of Drug Development* 1, Suppl. 3, 17–23.

-
- 254- Vogelman B, Gudmundsson S, Turnidge J, Leggett J, Craig WA. 1988. In vivo postantibiotic effect in a thigh infection in neutropenic mice. *Journal of Infectious Diseases* 157, 287–98.
- 255- Henry NK, Wilson WR, Geraci JE. 1986. Treatment of streptomycin-susceptible enterococcal experimental endocarditis with combinations of penicillin and low- or high-dose streptomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 30, 725–728.
- 256- Frazier DL, Rivière JE. 1987. Gentamicin dosing strategies for dogs with subclinical renal dysfunction. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 31, 1929–1934.
- 257- Fantin B, Pangon B, Potel G, Vallois JM, Caron F, Bure A, Carbon C. 1989. Ceftriaxone–netilmicin combination in single daily-dose treatment of experimental *Escherichia coli* endocarditis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 33: 767–770.
- 258- Fantin B, Carbon, C. 1990. Importance of the aminoglycoside dosing regimen in the penicillin–netilmicin combination for treatment of *Enterococcus faecalis*-induced experimental endocarditis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34, 2387–2391.
- 259- Saleh-Mghir A, Crémieux AC, Vallois JM, Muffat-Joly M, Devine C, Carbon C. 1992. Optimal aminoglycoside dosing regimen for penicillin-tobramycin synergism in experimental *Streptococcus adjacens* endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 2043–2047.
- 260- Francioli PB, Glauser MP. 1993. Synergistic activity of ceftriaxone combined with netilmicin administered once daily for treatment of experimental streptococcal endocarditis. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 37: 207–212.
- 261- Landman D, Quale JM. 1997. Management of infections due to resistant enterocci: a review of therapeutic options. *J Antimicrob Chemother.* 40. 161-170.

-
- 262- Tice AD, Poretz D, Cook F, Zinner D, Strauss MJ. 1998. Medicare coverage of outpatient ambulatory intravenous antibiotic therapy: a program that pays for itself. *Clin Infect Dis.* 27 : 1415-1421.
- 263- Andrews MM, Fordham von Reyn C. 2001. Patient selection criteria and management guidelines for outpatient parenteral antibiotic therapy for native valve infective endocarditis. *Clin Infect Dis.* 33 : 203-209.
- 264- Mainardi JL, Gutmann L, Acar JF, Goldstein FW. 1995. Synergistic effect of amoxicillin y cefotaxime against *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1984–1987.
- 265- Norrby SR, O'Reilly T, Zak O. 1993. Efficacy of antimicrobial agent treatment in relation to treatment regimen: experimental models and clinical evaluation. *J. Antimicrob. Chemother.* 21(Suppl. D): 41–54.
- 266- Gerber AU, Kozak S, Segessenmann C, Fluckiger U, Bangerter T, Greter U. 1989. Once-daily versus thrice-daily administration of netilmicin in combination therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a man adapted neutropenic animal model. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8: 33–237.
- 267- Wood CA, Norton DR, Kohlhepp SJ, Kohnen PW, Porter GA, Houghton DC, Brummett RE, Bennett WM, Gilbert DN. 1988. The influence of tobramycin dosage regimen on nephrotoxicity, ototoxicity and antibacterial efficacy in a rat model of subcutaneous abscess. *J. Infect. Dis.* 158: 13–22.
- 268- Gavaldà J, Cardona PJ, Almirante B, Capdevila JA, Laguarda M, Pou L, Crespo E, Pigrau C, Pahissa A. 1996. Treatment of experimental endocarditis due to *Enterococcus faecalis* using once-daily dosing regimen of gentamicin plus simulated profiles of ampicillin in human serum. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 173–178.
- 269- Fontana R, Boaretti M, Grossato A, Tonin EA, Lleo MM, Satta G. 1990. Paradoxical response of *Enterococcus faecalis* to the bactericidal activity of penicillin is associated with reduced activity of one autolysin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 314–320.

-
- 270- Baquero F, Negri MC. 1997. Selective compartments for resistant microorganisms in antibiotic gradients. *Bioessays* 19: 731–736.
- 271- Brandt CM, Rouse MS, Laue NW, Stratton NW, Wilson WR, Steckelberg JM. 1996. Effective treatment of multidrug-resistant enterococcal experimental endocarditis with combinations of cell wall-active agents. *J. Infect. Dis.* 173: 909–913.
- 272- Torres C, Tenorio C, Gavaldà J, Zarazaga M, Pahissa A, Baquero F. 1997. Ausencia de efecto sinérgico ampicilina-ceftriaxona en *Enterococcus faecium*, abstr. 24, p. 104. En Programa y abstracts de la 7º Reunión Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Madrid.
- 273- Hyatt JM, McKinnon PS, Zimmer GS, Schentag JJ. 1995. The importance of pharmacokinetic/pharmacodynamic surrogate markers to outcome. Focus on antibacterial agents. *Clin. Pharmacokinet.* 28: 143–160.
- 274- Hellinger WC, Rouse MS, Rabadan PM, Henry NK, Steckelberg JM, Wilson WR. 1992. Continuous intravenous versus intermittent ampicillin therapy of experimental endocarditis caused by aminoglycoside resistant enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 1272–1275.
- 275- Venditti M, Brandimarte C, Cassone M, Galiè M, Tarasi A, Tarasi D. 1997. Endocarditis caused by an *Enterococcus faecalis* high-level resistant to aminoglycosides: failure of ampicillin and ceftriaxone combined therapy, abstr. 178, p. 178. En Programa y abstracts del Fourth International Symposium on Modern Concepts in Endocarditis and Cardiovascular Infections, Yverdon-Les-Bains, Switzerland.
- 276- Almirante B, Gavaldà J, Tornos MP, Ribera E, Pahissa A. 1997. Effectiveness of ampicillin plus ceftriaxone or cefotaxime in the treatment of high-level aminoglycoside resistant (HLAR) *Enterococcus faecalis* infective endocarditis, abstr. 179, p. 179. En Programa y abstracts del Fourth International Symposium on Modern Concepts in Endocarditis and Cardiovascular Infections, Yverdon-Les-Bains, Switzerland.

-
- 277- Munckhoff WJ, Grayson ML, Turnidge JD. 1996. A meta-analysis of studies on the safety and efficacy of aminoglycosides given either once daily or as divided doses. *J. Antimicrob. Chemother.* 37: 645–663.
- 278- Chambers HF, Kennedy S. 1990. Effects of dosage, peak and trough concentrations in serum, protein binding, and bactericidal rate on efficacy of teicoplanin in a rabbit model of endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 34: 510–514.
- 279- Gavaldà J, Pahissa A, Almirante B, Laguarda M, Crespo E, Pou L, Fernández F. 1995. Effect of gentamicin dosing interval on gentamicin plus penicillin therapy of viridans streptococcal experimental endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 2098–2103.
- 280- Dorscher, CW, Tallan BM, Rouse M, Steckelberg JM, Chambers HC, Wilson WR. 1990. 30th ICAAC, abstr. 700.
- 281- Gavaldà J, Laguarda M, Capdevila JA, Pou L, Crespo E, Pahissa A. 1995. abstr. B44. En programa y abstracts del 35th Intersci. Conf. *Antimicrob. Agents Chemother.*
- 282- Francioli PB, Rouch W, Stamboulian D, and the International Infective Endocarditis Study Group. 1995. Treatment of streptococcal endocarditis with a single daily dose of ceftriaxone y netilmicin for 14 days: a prospective multicenter study. *Clin. Infect. Dis.* 21: 1406–1410.
- 283- Houlihan HH, Stokes DP, Rybak MJ. 2000. Pharmacodynamics of vancomycin and ampicillin alone and in combination with gentamicin once daily or thrice daily against *Enterococcus faecalis* in an in vitro infection model. *J. Antimicrob. Chemother.* 46:79–86.
- 284- Marangos MN, Nicolau DP, Quintiliani R, Nightingale CH. 1997. Influence of gentamicin dosing interval on the efficacy of penicillin-containing regimens in experimental *Enterococcus faecalis* endocarditis. *J. Antimicrob. Chemother.* 39: 519–522.

-
- 285- Schwank S, Blaser J. 1996. Once-versus thrice-daily netilmicin combined with amoxicillin, penicillin, or vancomycin against *Enterococcus faecalis* in a pharmacodynamic in vitro model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 2258–2261.
- 286- Moellering RC Jr. 1995. *Enterococcus* species, *Streptococcus bovis*, and *Leuconostoc* species. p. 1826–1860. En G. E. Mandell, J. E. Bennet, y R. Dolin (ed.), *Principles and practice of infectious diseases*, 4° ed. Churchill Livingstone, Inc., New York, N.Y.
- 287- Bisno AL, Dismukes WE, Durack DT, Kaplan EL, Karchmer AW, Kaye D, Rahimtoola SH, Sande MA, Sandford JP, Watanakunakorn C, Wilson WR. 1989. Antimicrobial treatment of infective endocarditis due to viridans streptococci, enterococci and staphylococci. *JAMA* 261:1471–1477.
- 288- Fekety R. 1995. Vancomycin and teicoplanin, part I, p. 346–354. En G. L. Mandell, J. E. Bennett, y R. Dolin (ed.), *Principles and practice in infectious diseases*, 4° ed. Churchill Livingstone, Inc., New York, N.Y.
- 289- Sullam PM, Tauber MG, Hackbarth CJ, Sande MA. 1985. Therapeutic efficacy of teicoplanin in experimental enterococcal endocarditis in rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27:135–136.
- 290- Lewis PJ, Martino P, Mosconi G, Harding I. 1995. Teicoplanin in endocarditis: a multicentre, open European study. *Chemotherapy.* 41: 399–411.
- 291- Leport C, Perronne C, Massip P, Canton P, Leclercq P, Bernard E, Lutun P, Garaud JJ, Vilde JL. 1989. Evaluation of teicoplanin for treatment of endocarditis caused by gram-positive cocci in 20 patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 871–876.
- 292- Martino P, Venditti M, Micozzi A, Brandimarte C, Gentile G, Santini C, Serra P. 1989. Teicoplanin in the treatment of gram-positive bacterial endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:1329–1334.

-
- 293- Presterl E, Graninger W, Georgopoulos A. 1993. The efficacy of teicoplanin in the treatment of endocarditis caused by gram-positive bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 31: 755–766.
- 294- Wilson APR, Gaya H. 1996. Treatment of endocarditis with teicoplanin: a retrospective analysis of 104 cases. *J. Antimicrob. Chemother.* 38: 507–521.
- 295- Venditti M, Tarasi A, Capone A, Galiè M, Menichetti F, Martino P, Serra P. 1997. Teicoplanin in the treatment of enterococcal endocarditis: clinical and microbiological study. *J. Antimicrob. Chemother.* 40: 449–452.
- 296- Francioli PB. 1993. Ceftriaxone and outpatient treatment of infective endocarditis. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 7: 97–115.
- 297- Livermore DM, Williams JD. 1996. Beta-Lactams: mode of action and mechanisms of bacterial resistance, p. 502–578. En V. Lorian (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*, 4th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
- 298- Carrizosa J, Santoro J, Kaye D. 1978. Treatment of experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis: comparison of cephalothin, cefazolin, and methicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13:74–77.
- 299- Rouse MS, Tallan BM, Henry NK, Steckelberg JM, Wilson WR. 1992. Animal models as predictors of outcome of therapy with broad spectrum cephalosporins. *J. Antimicrob. Chemother.* 29(Suppl. A):39–45.
- 300- Karchmer AW. 1995. Cephalosporins, p. 247–264. En G. L. Mandell, J. E. Bennett, y R. Dolin (eds.), *Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases*, 4th ed. Churchill Livingstone Inc., New York, N.Y.
- 301- Dhawan VK, Thadepalli H, Maier MK, Nayyar M, Bansal MB, Chuah SK. 1984. Newer beta-lactam antibiotics in the treatment of experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis. *J. Antimicrob. Chemother.* 14: 165–169.

-
- 302- Steckelberg JM, Rouse MS, Tallan BM, Osmon DR, Henry NK, Wilson WR. 1993. Relative efficacies of broad-spectrum cephalosporins for treatment of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* experimental infective endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 554–558.
- 303- Campos ME, Rabinovich S, Smith IM. 1974. Therapy of experimental staphylococcal infection with antibiotic combinations. *J. Lab. Clin. Med.* 83: 241–248.
- 304- Sande MA, Courtney KB. 1976. Nafcillin-gentamicin synergism in experimental staphylococcal endocarditis. *J. Lab. Clin. Med.* 88: 118–124.
- 305- Sande MA, Johnson ML. 1975. Antimicrobial therapy of experimental endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 131: 367–375.
- 306- Tallan BM, Rouse MS, Henry NK, Steckelberg JM, Wilson WR. 1991. En Programa y abstracts. 31st Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., Abstr. 364, p. 159.
- 307- López P, Gavaldà J, Martin MT, Almirante B, Gomis X, Azuaje C, Borrell N, Pou L, Falcó V, Pigrau C, Pahissa A. 2001. Efficacy of teicoplanin-gentamicin given once a day on the basis of pharmacokinetics in humans for treatment of enterococcal experimental endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1387–1393.
- 308- Sexton DJ, Tenenbaum MJ, Wilson WR, Steckelberg JM, Tice AD, Gilbert D, Dismukes W, Drew RH, Durack DT, and the Endocarditis Treatment Consortium Group. 1998. Ceftriaxone once daily for four weeks compared with ceftriaxone plus gentamicin once daily for two weeks for treatment of endocarditis due to penicillin-susceptible streptococci. *Clin. Infect. Dis.* 27: 1470–1474.
- 309- Join-Lambert O, Mainardi JL, Cuvelier C. et al. 1998. Critical importance of in vivo amoxicillin and cefotaxime concentrations for synergy in treatment of experimental *Enterococcus faecalis* endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* 42: 468–470.

- 310- Gavaldà J, Torres C, Tenorio C., et al. 1999. Efficacy of ampicillin plus ceftriaxone in treatment of experimental endocarditis due to *Enterococcus faecalis* strains highly resistant to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 43: 639–646.
- 311- Scheld WM, Sande MA. 1995. Endocarditis and intravascular infections. En Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 4^a ed. (Mandell GL., Bennett JE, y Dolin R, eds.), pp. 740–83. Churchill-Livingstone, New York. USA.
- 312- Gavaldà, J., Miró, J. M., Torres, C. et al. 2001. Abstract 1342, p. 466. Efficacy of ampicillin (A) plus ceftriaxone (Ctr) or cefotaxime (Cx) in the treatment of endocarditis due to *Enterococcus faecalis*. En Programa y Abstracts de la 41 ICAAC. ASM. Chicago. USA.
- 313- Caron F, Lemeland JF, Humbert G, et al. 1993. Triple combination penicillin-vancomycin-gentamicin for experimental endocarditis caused by a highly penicillin-and glycopeptide-resistant isolate of *Enterococcus faecium*. *J Infect Dis.* 168 : 681–686.